



TGR5, cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2 et ses complications métaboliques : de la chimie aux effets biologiques

Manuel Lasalle

► To cite this version:

Manuel Lasalle. TGR5, cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2 et ses complications métaboliques : de la chimie aux effets biologiques. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S023 . tel-01274155

HAL Id: tel-01274155

<https://theses.hal.science/tel-01274155>

Submitted on 15 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Sciences du médicament

Soutenue par **Manuel LASALLE**

Le 09 Octobre 2015

TGR5 : Cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2 et ses complications métaboliques. De la chimie aux effets biologiques.

Jury :

Docteur Francine ACHER	Université Paris Descartes	Rapporteur
Professeur Serge VAN CALENBERGH	Ghent University	Rapporteur
Docteur Olivier DEFERT	Amakem NV, Diepenbeek	Examineur
Docteur Julie CHARTON	Université de Lille 2	Directrice de thèse
Professeur Hélène GRAS	Université de Lille 2	Examineur
Professeur Benoit DEPREZ	Université de Lille 2	Examineur

Laboratoire *Médicaments et Molécules pour Agir sur les Systèmes Vivants*
INSERM U1177 – Institut Pasteur de Lille – Université de Lille 2
3^{ème} étage aile Ouest, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques
3, rue du P^r Laguesse. B.P. 83 59006 LILLE CEDEX.

TGR5 : Cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2 et ses complications métaboliques. De la chimie aux effets biologiques.

Résumé

Les acides biliaires sont depuis longtemps connus pour leur propriété d'agents solubilisant des graisses et des vitamines liposolubles, permettant ainsi une absorption efficace de ces nutriments lors de la digestion. Depuis les années 2000, plusieurs équipes ont montré que ces molécules étaient également dotées de propriétés de signalisation, en particulier via l'activation de deux récepteurs : le récepteur nucléaire FXR, et le récepteur membranaire TGR5.

Le récepteur TGR5 est exprimé dans de très nombreux tissus, dont les muscles lisses et squelettiques, le tissu adipeux brun, la vésicule biliaire, mais aussi certaines cellules immunitaires et certaines populations cellulaires intestinales telles que les cellules entéroendocrine L. Selon le tissu étudié, l'activation de TGR5 peut être suivie de nombreux effets biologiques. En particulier, au niveau intestinal, l'activation de ce récepteur stimule la sécrétion de l'hormone incrétine GLP-1.

Les hormones incrétones sont impliquées dans la régulation de la glycémie, en particulier dans la phase postprandiale, où elles concourent à potentialiser l'action de l'insuline, hormone hypoglycémisante majeure. Or, dans un contexte de diabète, et en particulier de diabète de type 2, l'organisme est devenu moins sensible à l'insuline, ce qui se traduit par un défaut de gestion de la glycémie, pouvant entraîner à terme des complications graves, telles que des amputations, une cécité, ou encore des problèmes cardiovasculaires. La prévalence et l'incidence de cette pathologie ont conduit l'OMS à la considérer comme la première épidémie d'origine non-infectieuse, ce qui illustre son impact sur la santé publique et le besoin médical constant qu'elle génère.

Dans ce contexte, TGR5 apparaît comme cible thérapeutique potentielle attrayante, de par l'effet GLP-1 sécrétagogue consécutif à son activation. En effet, parmi les thérapies antidiabétiques, deux classes de molécules basent leur efficacité sur une augmentation de la signalisation de la voie incrétine : les incréтинopotentiateurs (inhibiteurs de la DDP4, enzyme responsable de la faible demi-vie du GLP-1) et les incréтинomimétiques (agonistes synthétiques du récepteur au GLP-1). Récemment, cette dernière classe a également fait son apparition dans l'arsenal thérapeutique de l'obésité, confirmant l'intérêt de cette voie de signalisation dans les pathologies issues d'un désordre métabolique. L'obtention de composés GLP-1 sécrétagogues s'avère ainsi prometteuse et représente une approche complémentaire aux deux autres classes.

L'objectif de ce travail était donc d'obtenir des agonistes puissants, sélectifs et originaux du récepteur TGR5. Afin de diminuer les risques d'effets indésirables, on-target ou off-target, nous avons choisi de profiter de la localisation intestinale de notre cible d'intérêt en concevant nos composés de manière à limiter l'exposition au seul tractus gastro-intestinal, en limitant leur absorption. Ainsi, nous avons cherché à obtenir des composés non systémiques GLP-1 sécrétagogues.

La stratégie employée pour aboutir à ces composés a été le développement de molécules chimériques constituées d'une partie agoniste de TGR5, le pharmacophore, liée à un groupement permettant de limiter la perméabilité membranaire et donc l'absorption intestinale, le kinétophore. Après avoir optimisé la partie pharmacophore et identifié une position permettant l'ajout de différents types de kinétophores sans impact majeur sur l'activité du composé, nous avons pu obtenir plusieurs agonistes de TGR5 puissants, originaux, et dotés d'une très faible perméabilité membranaire. L'étude *in vivo* de ces molécules a ensuite permis de valider d'une part leur activité GLP-1 sécrétagogue, et d'autre part leur faible exposition systémique. Enfin, l'évaluation du potentiel thérapeutique d'un des meilleurs composés dans des modèles murins de diabète a récemment pu être initiée.

Mots clés : TGR5, agoniste, diabète, GLP-1, incrétine, topique, kinétophore.

TGR5 : Therapeutic target for the treatment of diabetes mellitus and its metabolic complications. From chemistry to biological effects.

Summary :

Bile acids have long been known as lipid solubilizing agents, enabling efficient absorption of nutrients and vitamins during digestion. Since 2000, several teams have demonstrated the signaling properties of these molecules, especially through the activation of two receptors : the nuclear receptor FXR and the membrane receptor TGR5.

The TGR5 receptor is expressed in various tissues, such as smooth and skeletal muscles, brown adipose tissue, gallbladder, but also on some immune or intestinal cell lines such as the enteroendocrine L cells. Depending on the studied tissue, TGR5 activation can trigger various biological effects. In the intestine, its activation can stimulate the secretion of an incretin hormone, the GLP-1.

Incretin hormones play a role in glycaemia regulation, especially during the postprandial phase during which they potentiate the action of the insulin, the main hypoglycemic hormone. Diabetes mellitus correspond to a decreased response of the organism to insulin signaling. This leads to a default in the glycaemia handling that can lead to serious complications, such as amputation, blindness, or cardiovascular problems. Prevalence and incidence of this disease have lead the WHO to define diabetes as the first non-infectious epidemic, illustrating its impact on public health and the constant need for new therapeutic opportunities.

In this context, TGR5 appears as an appealing potential therapeutic target, especially because of the GLP-1 secretagogue effect triggered by its activation. Indeed, among the antidiabetic therapeutic options, two classes of drugs work by increasing the incretin signaling: the incretinopotentiators (inhibitors of the DPP4, which is the enzyme responsible for the very short half-life of GLP-1), and the incretinomimetics (synthetic agonists of the GLP-1 receptor). Recently, this last class has also been approved to treat obesity. This demonstrates the interest of this signaling pathway in the treatment of metabolic disorders. Hence, GLP-1 secretagogue compounds may prove to be an interesting approach, and could complement the two other classes.

The aim of this work was then to obtain potent, selective and original agonists of the TGR5 receptor. In order to decrease the risk of on-target and off-target effects, we decided to take advantage of the intestinal localization of our target by designing compounds that would only expose the gastro-intestinal tract, by limiting their absorption. Thus, we wanted to obtain non systemic GLP-1 secretagogue compounds.

Our strategy was to develop chimeric compounds consisting of a pharmacophore part, which would be a potent and selective agonist of TGR5, linked to a kinetophore part, which would decrease membrane permeability. After having optimized the pharmacophore part and having identified a position where we could link various kinetophore moieties with only weak impact on the activity, we obtained several potent TGR5 agonists with very low membrane permeability. *In vivo* evaluations of these compounds have validated both their GLP-1 secretagogue activity and their low systemic exposure. In the end, evaluation of our lead compound on mouse model of diabetes was recently started.

Keywords : TGR5, agonist, diabetes, GLP-1, incretin, topical, kinetophore.

Les travaux présentés dans cette thèse sont encore confidentiels à l'heure actuelle. Ainsi, la diffusion de ce document est limitée aux rapporteurs de cette thèse et la consultation par toute autre personne est soumise à l'autorisation du laboratoire INSERM U1177.

Avant propos

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe du Professeur Benoit Déprez, au laboratoire *Médicaments et Molécules pour Agir sur les Systèmes Vivants*, unité Inserm U1177.

Je tiens à remercier les trois tutelles du laboratoire : l'Université de Lille 2, l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale et l'Institut Pasteur de Lille, ainsi que la faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de Lille pour leur soutien logistique et financier. Je tiens également à remercier le PRIM et la SATT Nord, pour le financement du projet, et enfin l'Université de Lille 2 et le Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais pour le financement de ma thèse.

Le projet dans lequel s'inscrivent ces travaux est le fruit d'une collaboration étroite avec les membres de l'équipe Inserm U1011 *Récepteurs nucléaires, Maladies Cardiovasculaires et Diabète* dirigée par le Professeur Bart Staels.

Les expériences RMN ont été effectuées au *Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire* (LARMN) dirigé par le Professeur Nathalie Azaroual.

Les structures radio-cristallographiques ont été déterminée par le Docteur Pascal Roussel, membre de l'*Unité de Catalyse et de Chimie du Solide* (UCCS, CNRS UMR 8181).

Remerciements

Madame Francine Acher et Monsieur Serge Van Calenbergh

Je suis très honoré de l'intérêt que vous avez porté à ces travaux en acceptant d'en être les rapporteurs. Veuillez recevoir toute ma gratitude.

Monsieur Olivier Defert

Je vous suis sincèrement reconnaissant d'avoir accepté de juger ce travail et d'apporter votre vision industrielle à ce jury de thèse.

Madame Hélène Gras

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Sachez que je vous suis particulièrement reconnaissant pour m'avoir accompagné tout au long de mes années d'études.

Monsieur Benoit Déprez

Je souhaite vous remercier tout particulièrement, pour avoir accepté de participer à ce jury bien sûr, mais surtout pour la confiance que vous m'avez accordé depuis le début, pour les enseignements, la rigueur et la passion que vous avez su me transmettre.

Madame Julie Charton

Sachez que je vous suis profondément reconnaissant pour l'ensemble de notre parcours commun. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Pour commencer ces remerciements moins formels, je souhaite adresser à Monsieur Benoît Déprez une immense merci. Il y a 8 ans est entré dans ce laboratoire un jeune étudiant qui ne peut aujourd'hui que vous être profondément reconnaissant. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire, de m'avoir suivi, guidé, fait grandir, tant professionnellement qu'humainement. Merci pour toute la connaissance que vous m'avez transmise, pendant vos cours captivants et pendant tous les moments d'échange au laboratoire. Merci aussi pour votre vision si motivante des projets que vous m'avez confié. Je me sens privilégié d'avoir pu apprendre autant à vos côtés.

A ma directrice de thèse, je souhaite d'abord te rassurer en te disant que non, je ne vais pas commencer à te vouvoyer, malgré ce que laisse penser la page précédente. Julie, comment te remercier suffisamment pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces dernières années ? Tes connaissances, ton expérience (« vas-y, fais-le, ça ne marchera pas mais fais-le ! ») et ta confiance m'ont guidé et soutenu tout au long de cette thèse. Mis à part l'aspect scientifique, la thèse est une aventure humaine avant tout, de longue haleine qui plus est ! Et je ne peux sincèrement imaginer meilleure directrice de thèse. Ta gentillesse, ta disponibilité, ton soutien, ton empathie, ta joie de vivre, sont des éléments ancrés dans ta personnalité, et que j'apprécie profondément. Tu as su me guider quand je m'égarais, me remotiver quand je baissais les bras, me soutenir quand le moral flanchait, et rire avec moi quand le moment se présentait. Tu mérites bien plus d'orchidées que celles qui sont dans ton bureau, et j'espère pouvoir parler chimie ou oiseaux avec toi pendant encore de nombreuses années !!

A TERENCE Beghyn, cette thèse est un peu l'aboutissement d'un processus que j'ai entamé à tes côtés. Tu m'as appris beaucoup, tu m'as fait confiance, et j'ai pu découvrir et apprécier à tes côtés un métier, un monde professionnel, auquel j'ai finalement décidé d'appartenir. J'apprécie toujours autant les discussions que nous pouvons avoir au détour d'un couloir ou d'un café. Merci aussi pour ta présence et ton soutien ces derniers mois, Julie et toi avez été d'une aide précieuse.

A Marion Flipo, ma « tutrice pédagogique », (ça se fait apparemment de te donner ce titre dans les remerciements !), merci pour ton écoute, ton enthousiasme, et pour tous les conseils que tu as pu me prodiguer depuis le début. Et merci aussi pour ton aptitude quasi-magique à faire fonctionner la Varian quand elle ne se laisse pas dompter !

A Nicolas Willand, merci pour ta disponibilité, ta sympathie, et ton humour. J'ai appris beaucoup en discutant avec toi, au labo ou ailleurs, et j'espère que tu as apprécié ces moments d'échange autant que moi. Et au passage, merci aussi pour m'avoir initié au monde moderne, découverte majeure dans ma vie lilloise!

A Rebecca Deprez, merci pour l'aide et les connaissances que tu m'as apportées durant toutes ces années, pendant ma thèse et aussi avant, en MMDDM et en indus'. Merci aussi pour ta confiance et ton aide dans ma recherche de l'après-thèse. Et

merci pour les séances mots fléchés à la cafét', ça ne va pas être facile de retrouver un tel niveau ailleurs !

A Hélène Gras, merci pour m'avoir accompagné durant tout mon parcours à la fac. Que ce soit en master, à la revue, en indus', pendant mon M2 ou ma thèse, j'ai toujours apprécié ta générosité, ton sens de l'humour, ta vision des sciences en général, et du médicament en particulier. J'ai beaucoup de chance d'avoir bénéficié de toute ton expérience et de toutes tes connaissances.

A Jean-Claude Gesquière, merci pour les enseignements de chimie organique, les précieux conseils durant ma thèse, et les discussions partagées à la cafét' autour d'un bon café !

A André Tartar, merci de m'avoir transmis toutes ces connaissances, votre manière d'envisager le monde de l'industrie pharmaceutique, votre vision de la découverte de médicaments. Vous avez éveillé en moi une curiosité (en MMDDM) qui ne s'est toujours pas éteinte depuis. Merci aussi pour votre aide et votre implication concernant mon après-thèse.

A mes co-thésards : Antoine, Gonzague, Chau, Hugues, Paul, Vanessa, Abdallah. Merci d'avoir fait de cette aventure une histoire de soutien, de partage et d'amitié. J'espère lever le coude à vos côtés encore de nombreuses fois !

Hugues, tu mérites un remerciement tout particulier pour l'oreille attentive et l'épaule solide que tu as été cette année. Merci à toi et à ta petite femme d'avoir été présents quand j'en avais besoin ! Vous êtes des crèmes !

A Carole Desruelles et à Nathalie Dekeyne, mes « tatas du labo », je vous remercie du fond du cœur pour votre soutien, matériel et administratif certes (car sans vous on ne fait rien !), mais surtout pour votre présence, votre écoute, votre joie de vivre, vos conseils, votre bonne humeur, et pour toutes les discussions plus ou moins longues et plus ou moins sérieuses qui ont ensoleillé mes journées au labo.

A Sylvain Picon, je te remercie sincèrement d'avoir été à mes côtés au début de cette aventure. Tes conseils avisés, ta patience et ta disponibilité, m'ont permis d'apprendre énormément. Le tout agrémenté de discussions particulièrement sympathiques sur les vacances, le sport en général, le rugby en particulier...Que demander de plus !

A Rajaa Boulahjar, ma collègue de bureau et de paillasse, merci pour ton aide et tes conseils. Merci aussi pour ta tolérance à ma présence sonore et pour tes petites pointes d'humour, sobres, mais particulièrement efficaces.

A Catherine Piveteau, merci pour ta gentillesse et ta disponibilité, pour les centaines de tubes analysés, pour ta bonne humeur, ton soutien et pour ta capacité à débloquer les grilles de mots fléchés insolubles !

A Marilyne Bourotte, merci pour ton enthousiasme, ta bonne humeur et ton humour. Je suis sûr que le mien va te manquer quand je serai parti ! Et à toi aussi, merci pour les séances mots fléchés du midi : ça c'est de la pause efficace !

A Baptiste Villemange (pas sûr de l'orthographe !), merci pour ta bonne humeur, pour Eddy le quartier, pour les relectures de CV et lettres de motivation, pour ton aide quand tu finissais ta thèse, et surtout quand je finissais la mienne. « Deus rex, sed deus maxima » (ça ne veut rien dire, mais c'est ce que j'ai trouvé de plus sincère).

A l'ensemble des membres passés et présents de l'U1177, anciennement U761, en particulier et dans le désordre à Damien Bosc, Ronan Gealageas, Jouda Jakhlal, Tristan Verdelet, Cyril Ronco, Arnaud Bourin, Jamal El Bakali, Catalin Pintiala, Nicolas Cousaert, Irena Reboule, Nicolas Probst, Artur Pinto, Arnaud Matthieu, Aurélie Beghin, Ingrid Ciliberti, Adrien Herledan, Julie Dumont, Valérie Landry, Florence Leroux, Cyril Couturier, Xavier Maréchal, ainsi qu'à tous les stagiaires étant passés par là, merci d'avoir fait des moments partagés ensemble de très bons souvenirs.

Merci également aux membres de l'équipe U1011 que j'ai croisés au cours de ces trois ans, et en particulier Anne Tailleux, Nathalie Hennuyer, Bart Staels et Loïc Bellay. Ça a été un réel plaisir de travailler avec vous et d'apprendre à vos côtés.

Merci à la team Space Jam d'Eurasanté ! C'était un réel plaisir hebdomadaire que de tâter le cuir avec vous, et de se défouler tous ensemble dans la joie et la bonne humeur.

Merci à ma deuxième famille de l'Harmonie municipale de Guînes, et en particulier à Ludô, Jérôme, Francis, Maurice, Jérémy et Aline, Alison, Constant, Alexis, Antoine, François, sans oublier l'incontournable papi "Henry VIII" Michel ! Quel bonheur ça a été de grandir à vos côtés

A Pierrot, merci pour tout ! Pour ton amitié, ta sincérité, ton soutien, pour m'avoir fait chanter un peu à la plage, un peu plus à la revue, et maintenant bien plus avec les BigBellies ! Pour les séances Pikmins et Portal, les parties de Wanted et de Gosu, j'en passe et des meilleures ! Let's rock together for the next hundred years!!

A mes comparses du club des 4, Antoine "M", Antoine "G" et Luc "T", merci pour toutes ces années passées ensemble sur les bancs des amphis, entre 8h et minuit. Merci pour la revue, merci pour les soirées animées, merci pour l'île Maurice et Center Park. Merci aussi pour votre présence bienveillante, vos blagues à mourir de rire, vos expressions "innovantes", les checks welsh, et autres subtilités de langages ("... et comme il n'y a rien qui bouge..."). Je ne peux vous souhaiter qu'une chose : que les années à venir nous apportent autant de rire que celles qui viennent de passer.

A mes amis : Clémence, Olivier, Julie, Laurine, Magalie, Camille, Ryad, Jean-Baptiste, Mathilde, Geoffrey, Pierre-Emmanuel, Edouard, Laura, Pauline, Camille, Timothée, Marine, Erwan, Nathalie, Céline, Simone, Guillaume, Joseph, Antoine, Jérémy, Carole, Audrey, Bertrand, Alexandre, Jonathan, ... Merci d'être vous, d'être à mes côtés, et d'avoir grandi avec moi. Ces choses-là ne s'effacent pas, et les années à venir ne peuvent que nous réserver d'autres belles lignes à écrire.

A ma famille, tatas tontons, cousins cousines, parrain marraine, merci de m'avoir si bien entouré depuis si longtemps. Je suis fier d'avoir grandi parmi vous, et d'être qui je suis grâce à vous.

A Maman, à Papa, merci du fond du cœur. Pour votre soutien indéfectible, votre patience et votre amour. Sans vous je ne suis rien, grâce à vous je suis quelqu'un. Je suis rarement fier de quelque chose, mais une chose est sûre, je suis fier d'être votre fils.

A Etienne, mon grand petit frère. Nous avons vécu ces trois années chargées (c'est le terme adéquate je pense) ensemble, et ta présence a été cruciale de nombreuses fois, et pas seulement pour aller chercher le pain ! Nos envolées lyriques, comiques ou littérales sont le meilleur anti-stress au monde. Je suis en tout cas le plus heureux et chanceux des grands frères, de t'avoir comme petit frère !

A Papi, Mamie, Men'née et Pami. Mes grands-parents bien aimés, cette thèse est un peu la vôtre, car je suis un peu de chacun de vous. Votre présence m'accompagne au quotidien. Merci pour tout.

Sommaire

Avant propos	- 7 -
Remerciements	- 9 -
Sommaire	- 15 -
Table des abréviations.....	- 19 -
A. Général	- 19 -
B. Chimie.....	- 21 -
Introduction.....	- 23 -
I. Le diabète et les désordres métaboliques.....	- 25 -
A. Epidémiologie et physiopathologie du diabète.	- 25 -
B. Epidémiologie et physiopathologie de l'obésité.	- 28 -
C. Epidémiologie et physiopathologie du syndrome métabolique.....	- 32 -
D. Traitements actuels.....	- 34 -
1. Mesures hygiéno-diététiques.....	- 34 -
2. Traitements pharmacologiques du diabète de type 2	- 35 -
3. Traitements de l'obésité.....	- 40 -
4. Conclusions sur les traitements du diabète et de l'obésité	- 42 -
E. Focus sur la voie incrétine	- 43 -
1. Généralités.....	- 43 -
2. Effets du GLP-1	- 43 -
3. La voie incrétine et son utilisation en thérapeutique	- 46 -
II. Le récepteur TGR5	- 47 -
A. Généralités sur les acides biliaires	- 47 -
B. Caractérisation	- 48 -
1. Ligands endogènes de TGR5.....	- 49 -
2. Expression de TGR5 et localisation tissulaire	- 50 -
3. Voies de signalisation associées à TGR5 et effets biologiques.....	- 51 -
C. Intérêts et limites du récepteur TGR5 en thérapeutique	- 58 -
D. Agonistes non stéroïdiens décrits du récepteur TGR5 et leurs effets biologiques...	- 60 -
1. 3-Aryl-4-isoxazolecarboxamides.....	- 61 -

Sommaire

2.	1-hydroxyimino-3,3-diphenylpropanes	- 61 -
3.	Trifluorométhyl(pyrimidin-2-yl)azetidine-2-carboxamides	- 63 -
4.	[1,2,3]triazoles et tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidine amides	- 64 -
5.	4-Phenoxynicotinamides	- 65 -
6.	Conclusions	- 66 -
III.	Stratégies d'obtention de composés topiques intestinaux	- 69 -
A.	Généralités	- 69 -
1.	L'instabilité métabolique	- 69 -
2.	La faible perméabilité	- 70 -
B.	Notion de kinétophore	- 73 -
C.	Conclusion	- 76 -
IV.	Optimisation du pharmacophore	- 79 -
A.	Criblage à haut débit sur le récepteur TGR5	- 79 -
1.	Principe du test primaire de transactivation	- 79 -
2.	Résultats du criblage	- 80 -
B.	Série des 3-amino-5-thio-[1,2,4]triazoles	- 81 -
1.	Rationnel de conception des composés	- 81 -
2.	Synthèse	- 82 -
3.	Activités sur le récepteur TGR5	- 88 -
C.	Série des 5-amino-2-thioimidazoles	- 92 -
1.	Rationnel de conception des composés	- 92 -
2.	Synthèse de l'analogue imidazole du composé 8	- 92 -
3.	Première série d'analogues	- 99 -
4.	Seconde série d'analogues	- 105 -
D.	Conclusion sur l'optimisation du pharmacophore	- 114 -
V.	Optimisation du kinétophore	- 117 -
A.	Rationnel du choix des groupements kinétophores	- 117 -
B.	Définition de la position portant le kinétophore	- 118 -
1.	Synthèse	- 118 -
2.	Activité biologique	- 120 -
C.	Variation du groupement kinétophore	- 121 -
1.	Composés ioniques	- 121 -

Sommaire

2. Composés PEGylés.....	- 122 -
D. Evaluation des composés à visée topique intestinale.	- 131 -
1. Activité sur le récepteur TGR5.....	- 131 -
2. Activité GLP-1 sécrétagogue <i>in vitro</i>	- 134 -
3. Evaluation des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques.....	- 135 -
E. Caractérisation <i>in vivo</i> des composés à visée topique intestinale.....	- 142 -
1. Validation de l'effet GLP-1 sécrétagogue	- 143 -
2. Etudes des différents kinétophores	- 149 -
3. Optimisation de la fenêtre de lecture de l'effet GLP-1 sécrétagogue	- 157 -
F. Conclusion sur l'optimisation du kinétophore	- 161 -
Conclusion et perspectives.....	- 163 -
Bibliographie	- 165 -
Tables des illustrations.....	- 173 -
A. Figures	- 173 -
B. Tableaux	- 177 -
C. Schémas.....	- 177 -
VI. Partie expérimentale.....	- 179 -
A. Chemistry	- 179 -
1. General Information	- 179 -
2. 5-amino-3-thio-[1,2,4]triazoles	- 181 -
3. 5-amino-2-thio-imidazoles	- 192 -
B. Compound evaluation	- 276 -
1. Physicochemical properties.....	- 276 -
2. TGR5/CRE Luciferase assay.....	- 276 -
3. ADME	- 277 -
4. <i>In vivo</i> GLP-1 secretion	- 278 -

Table des abréviations

A. Général

% _{trans} max	pourcentage maximal de transactivation du récepteur
5-HT	Sérotonine
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BAT	tissu adipeux brun
CA	acide cholique
CDCA	acide chénodéoxycholique
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cl _{int}	Clairance microsomale intrinsèque
DCA	acide déoxycholique
DPP4	DiPeptidylPeptidase 4
EC ₅₀	Concentration Efficace à 50%
FEVB	Fraction d'éjection de la vésicule biliaire
Fsk	forskoline
FXR	Farnesoïd X Receptor
GIP	glucose-dependent insulintropic peptide
GLP-1	Glucoagon-Lik-Peptide 1
HBA _{1c}	Hémoglobine glyquée A 1 c
IBMX	3-isobutyl-1-méthylxanthine
IMC	Indice de masse Corporelle
LCA	acide lithocholique

Table des abréviations

mPEG	éther méthylique de polyéthylène glycol
NO	oxide nitrique, monoxide d'azote
OGTT	épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale
P _{app}	Perméabilité membranaire apparente
PKA	Protéine kinase A
T3	3,3',5-triiodo-L-thyronine
T4	L-thyroxine
TGR5	Takeda G Receptor 5

B. Chimie

μW	irradiation micro-onde
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole
DABCO	1,4-azabicyclo[2,2,2]octane
DCM	Dichlorométhane
DIBAL-H	hydrure de diisobutylaluminium
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMBA	acide N,N'-diméthylbarbiturique
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
éq.	équivalent
EtOAc/AcOEt	acétate d'éthyle
EtOH	éthanol
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
MeOH	méthanol
MS 4A	tamis moléculaire 4 Å
MsCl	chlorure de mésyle
PFA	paraformaldéhyde
ppm	partie par million
RMN	résonance magnétique nucléaire
RP-HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase inverse
t.a.	température ambiante
T3P	anhydride cyclique de l'acide propylphosphonique
TBAF	Fluorure de tetrabutylammonium
<i>t</i> Boc	tert-Butoxycarbonyl
TCDI	1,1'-thiocarbonyldiimidazole
TEA	triéthylamine
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TsCl	chlorure de tosyle

Table des abréviations

Introduction

Le mode de vie des pays industrialisés, caractérisé notamment par des déséquilibres alimentaires, de la sédentarité, du stress, favorise la survenue de ce que l'Organisation Mondiale de la Santé qualifie « d'épidémie » de diabète. Cette pathologie se développe fréquemment sur un fond d'obésité, ou de dyslipidémie, maladies métaboliques qui en compliquent la prise en charge médicale. Le terme syndrome métabolique désigne d'ailleurs le développement de ces différentes pathologies chez un même individu.

Dans la lutte contre ces pathologies métaboliques, et en particulier dans les stades précoces, les mesures hygiéno-diététiques ont un rôle très important, car elles peuvent à elles seules suffire à retarder l'évolution en s'opposant au déséquilibre énergétique du patient, qui est souvent la cause principale de la maladie.

Cependant, la mise en place de telles mesures est compliquée, puisqu'elle implique une très grande observance du patient à l'égard des règles qui lui sont proposées, règles qui se traduisent en général par des changements assez conséquents dans ses habitudes. Dans ce cadre, il est intéressant d'accompagner les mesures hygiéno-diététiques proposées par un traitement pharmacologique adapté, afin d'obtenir un effet plus marqué sur la ou les pathologies.

Il existe cependant deux difficultés notables dans la prise en charge de maladies métaboliques multiples chez un même individu : la première est que les arsenaux thérapeutiques disponibles pour chaque maladie sont parfois insuffisamment diversifiés. Il est donc possible que le clinicien se trouve devant une impasse thérapeutique, après avoir épuisé toutes les options. D'autre part, prendre en charge plusieurs pathologies simultanément nécessite souvent l'utilisation de plusieurs principes actifs, chacun ayant un impact sur une des pathologies visées. Rares en effet sont les médicaments ayant un impact direct sur plusieurs pathologies. Or, multiplier le nombre de traitements diminue l'observance du patient et génère un risque d'interaction, qui peut entraîner l'inefficacité d'un des traitements, voire même l'apparition d'effets indésirables toxiques pour le patient. Face à ces deux problématiques, le développement de molécules nouvelles ayant des cibles pharmacologiques innovantes est particulièrement motivant, car elles pourraient permettre d'élargir les stratégies thérapeutiques disponibles.

Dans ce contexte, plusieurs études ont révélé l'existence d'une cible thérapeutique potentielle nouvelle particulièrement intéressante, qui aurait un impact positif sur plusieurs aspects du diabète, du syndrome métabolique, et des complications cardiovasculaires associées. Cette cible est le récepteur membranaire sensible aux acides biliaries, GPBAR-1 (G Protein-coupled Bile Acid Receptor 1), aussi appelé TGR5 (pour Takeda G-protein-coupled Receptor 5).

Les acides biliaires, bien qu'avant tout connus pour leur propriété d'agents tensioactifs, et leur rôle dans l'absorption intestinale des graisses et vitamines liposolubles, sont depuis une quinzaine d'années également reconnus pour leur propriété de signalisation via l'activation de différents récepteurs. Ils ont tout d'abord été décrits comme les agonistes naturels du récepteur nucléaire FXR¹ (Farnesoid X Recepteur). L'activation de ce récepteur par des acides biliaires permet un maintien de l'homéostasie des acides biliaires, en particulier via la modulation de l'expression d'enzymes indispensables dans l'anabolisme de ces molécules.

La découverte du récepteur TGR5 en 2002-2003^{2, 3} a étoffé les capacités de signalisation des acides biliaires. De par sa localisation tissulaire très variée, et les divers effets observés suite à son activation, qui seront détaillés par la suite, TGR5 joue le rôle de senseur de l'état prandial de l'organisme, favorisant la réaction du corps à l'incorporation des nutriments lors de la digestion.

L'utilisation de ces effets pour rétablir l'équilibre énergétique chez des individus atteints de désordres métaboliques tels que le diabète ou l'obésité a alors été envisagée. Ainsi, il a été observé que l'administration d'acides biliaires (acide cholique) à hautes doses chez des souris nourries en régime dit « High Fat » entraînait une normalisation du poids en une trentaine de jours⁴. Cet effet est lié au récepteur TGR5, et est indépendant du récepteur FXR. Il a également été démontré que l'administration d'un agoniste sélectif du récepteur TGR5 chez un modèle de souris diabétiques entraînait une amélioration TGR5-dépendante des paramètres physiologiques liés au diabète⁵.

Suite à ces différentes études, il me paraît intéressant de répondre à la problématique suivante : dans quelle mesure le récepteur TGR5 peut-il être considéré comme une cible thérapeutique dans le traitement du diabète, du syndrome métabolique, et des complications associées ?

Afin de poser clairement le cadre de cette réflexion, je commencerai par dresser un bref état des lieux concernant la physiopathologie du diabète et de ses complications métaboliques, ainsi que de l'obésité, en m'attardant sur la physiologie de la voie incrétine et son potentiel thérapeutique. Je décrirai par la suite l'état de l'art concernant le récepteur TGR5 et illustrerai son potentiel thérapeutique par quelques exemples issus de la littérature. Je présenterai enfin la stratégie que j'ai envisagée afin de développer de nouveaux agonistes de TGR5 dans le but d'obtenir des candidats cliniques.

I. Le diabète et les désordres métaboliques

Le diabète de type 2, non insulino-dépendant, sera la pathologie centrale de ce travail. Seront également abordés l'obésité, et le syndrome métabolique. Ce dernier n'est pas à proprement parler une maladie, mais englobe plutôt un ensemble de dérèglements métaboliques de l'organisme.

Toutes ces pathologies métaboliques sont non génétiques, c'est-à-dire qu'elles sont dues à un déséquilibre multifactoriel dans le métabolisme de l'organisme. Si des facteurs génétiques entrent en jeu, ils ne sont pas suffisants à eux seuls pour entraîner l'apparition de la maladie.

Le métabolisme d'un organisme correspond à l'ensemble des transformations nécessaires à son bon fonctionnement, qu'elles soient énergétiques ou moléculaires. On peut étendre cette définition à l'ensemble des besoins énergétiques d'un organisme. L'équilibre énergétique correspond à l'adéquation entre l'apport énergétique de l'alimentation, sa répartition qualitative et quantitative, et la dépense énergétique de l'individu.

Or, ces facteurs peuvent facilement varier et le mode de vie dit occidental, c'est-à-dire celui des pays industrialisés, favorise l'installation d'un déséquilibre énergétique. D'une part, la sédentarité diminue les besoins énergétiques, d'autre part, l'alimentation va générer un apport trop important et mal équilibré qualitativement. Ce déséquilibre énergétique est la principale cause de l'apparition de pathologies telles que l'obésité, certaines dyslipidémies, ou encore le diabète.

A. Epidémiologie et physiopathologie du diabète.

Le diabète est une pathologie métabolique issue d'un défaut dans la gestion du glucose, défini par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L. L'épidémiologie de cette pathologie a conduit l'OMS à considérer le diabète comme une épidémie, une première pour une maladie non contagieuse. En 2006, la prévalence de cette pathologie était estimée à 6.3 % de la population mondiale, soit 246 millions de personnes⁶. A l'heure actuelle, cette estimation a atteint 8.3 % de la population mondiale, soit 382 millions de diabétiques (Figure 1), et prévoit un dépassement du seuil des 10% en 2035, avec 592 millions de personnes atteintes⁷. Cette pathologie est en augmentation dans les pays dits industrialisés, mais surtout dans les pays émergents comme la Chine ou le Brésil.

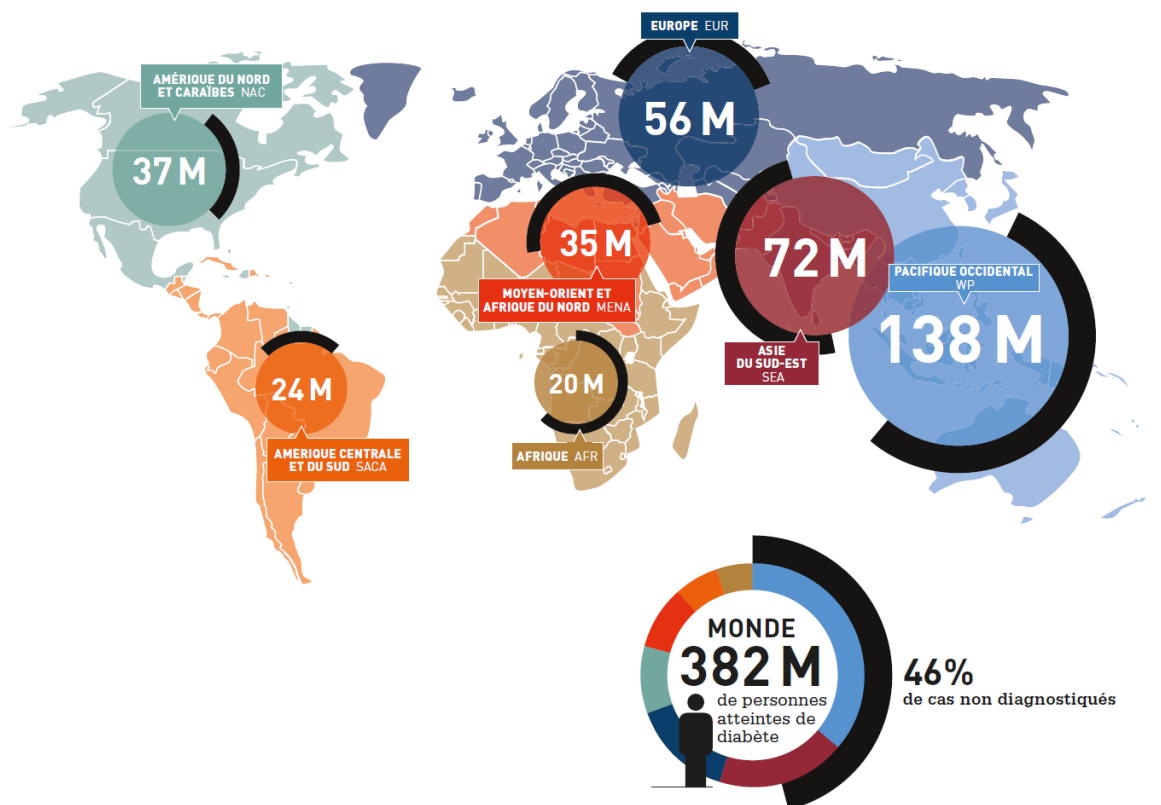


Figure 1 : Nombre de personnes atteintes du diabète, par région de la Fédération internationale du diabète⁷

Cette maladie métabolique, qui correspond à un dysfonctionnement du système de régulation de la glycémie, existe principalement sous deux formes, qui diffèrent par leur origine physiopathologique, leur épidémiologie, et leur traitement.

Le diabète de type 1, dit insulino-dépendant, provient d'une destruction d'origine auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques. Le diabète apparaît quand plus de 80 % des cellules β sont détruites. Il peut survenir chez l'enfant comme chez l'adulte, et nécessite dans sa prise en charge l'utilisation d'insuline thérapeutique.

Nous ne nous intéresserons pas à ce type de diabète, mais plutôt au diabète de type 2. Celui-ci est dit non insulino-dépendant. C'est un diabète qui apparaît chez l'adulte et la personne âgée. Il est en général multifactoriel et favorisé par l'obésité ou le surpoids, les antécédents familiaux et l'appartenance à certaines ethnies.

D'un point de vue physiopathologique, il apparaît d'abord un phénomène de résistance à l'insuline au niveau des muscles et du tissu adipeux en particulier. La résistance à l'insuline se traduit par la nécessité d'avoir une concentration plasmatique d'insuline supérieure à la normale pour observer des effets sur les organes cibles. Cette résistance est suivie d'une compensation de l'insulino-sécrétion pancréatique, qui tend à augmenter. Un cercle vicieux

s'installe ensuite, qui va conduire à un épuisement du pancréas, aboutissant à une anomalie de l'insulino-sécrétion, qui peut conduire à une insulino-pénie.

D'un point de vue biologique, il existe différents paramètres entrant dans la définition d'un diabète :

Un des tests permettant le diagnostic est l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO). Il consiste à évaluer la capacité d'un individu à réagir à l'absorption par voie orale de glucose. 2 heures après l'absorption de 75 g de glucose, si la glycémie est supérieure à 1,4 g/L, le sujet est dit intolérant au glucose (état prédiabétique), si elle est supérieure à 2 g/L, le sujet est diabétique. L'évolution d'un diabète est suivie via le pourcentage d'hémoglobine glyquée HbA_{1c}. Ce paramètre est considéré comme étant le reflet de l'état glycémique d'un patient durant les 3 derniers mois. La glycation est un processus normal du catabolisme des oses, qui correspond à la fixation non-enzymatique de résidus d'oses sur les fonctions aminées des protéines telles que l'hémoglobine. Chez un sujet sain, le pourcentage d'hémoglobine glyquée HbA_{1c} est compris entre 4 et 6 %.

Quel que soit le type de diabète, la morbi-mortalité associée est due à deux phénomènes : l'atteinte des gros vaisseaux sanguins : macroangiopathie, qui favorise les coronaropathies par exemple, augmentant le risque d'accidents cardiovasculaires ; et l'atteinte des capillaires, la microangiopathie, qui peut avoir des répercussions sur les yeux, le rein, les nerfs. Les complications microangiopathiques sont spécifiques au diabète. En France, le diabète est la première cause de cécité, de dialyse, et d'amputation. L'ensemble de ces complications est résumé dans la Figure 2.

Le diabète et les désordres métaboliques

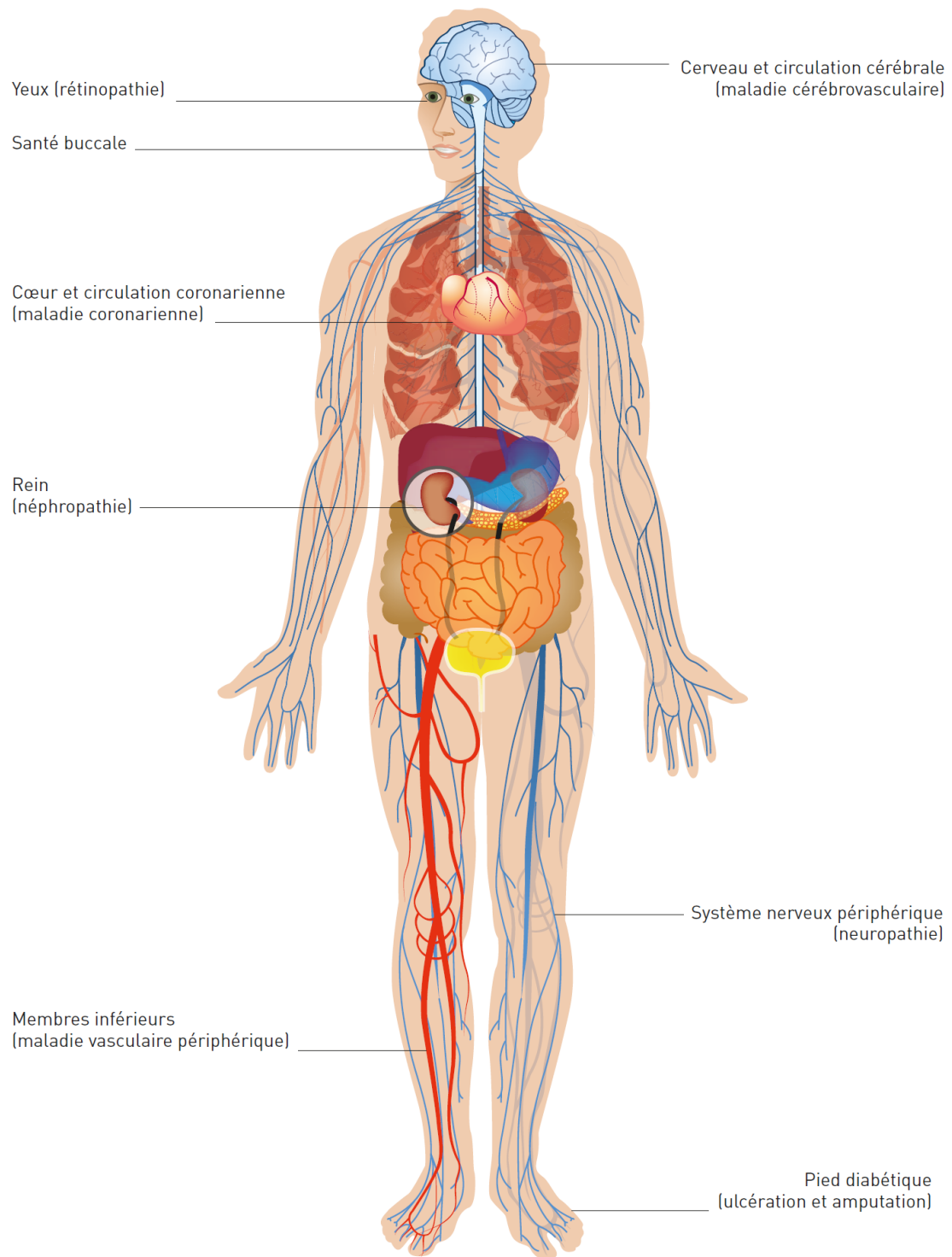


Figure 2 : Complications majeures du diabète⁷

B. Epidémiologie et physiopathologie de l'obésité.

L'obésité correspond à une accumulation trop importante des graisses par l'organisme. Cette accumulation est telle qu'elle devient dangereuse pour l'individu, générant des risques

de développer diverses pathologies telles que l'arthrose, l'apnée du sommeil, le diabète de type 2 ou des maladies cardiovasculaires, et diminuant son espérance de vie⁸. Le paramètre utilisé pour définir l'obésité est l'Indice de Masse Corporelle (IMC), c'est-à-dire le ratio entre la masse de l'individu et le carré de sa taille.

$IMC = \frac{masse\ (kg)}{(taille\ (m))^2}$. Un IMC normal (c'est-à-dire sans risque pour la santé de l'individu) est compris entre 18 et 25 $kg.m^{-2}$. Un individu est déclaré obèse si son IMC est supérieur à 30 $kg.m^{-2}$. Le tour de taille est aussi un paramètre à considérer. S'il est supérieur à 102 cm chez les hommes et 88 cm chez les femmes, alors le sujet est obèse. Ces normes ont été adaptées en fonction des ethnies. Elles sont par exemple plus faibles chez les asiatiques⁸.

L'obésité est une pathologie très préoccupante pour plusieurs raisons. D'une part, sa prévalence est en augmentation constante de par le monde, et même si la vitesse d'augmentation semble diminuer depuis les années 2000 (Figure 3), aucun pays n'a pu observer de diminution de cette prévalence depuis au moins 1980⁹. Mais surtout, elle favorise l'apparition de nombreuses autres maladies, diminue l'espérance de vie¹⁰ et est à l'heure actuelle très difficile à traiter. C'est une pathologie qui touche surtout les adultes, mais elle est aussi présente dès l'adolescence (Figure 4), en particulier dans les pays industrialisés tels que l'Amérique du nord ou l'Europe de l'ouest.

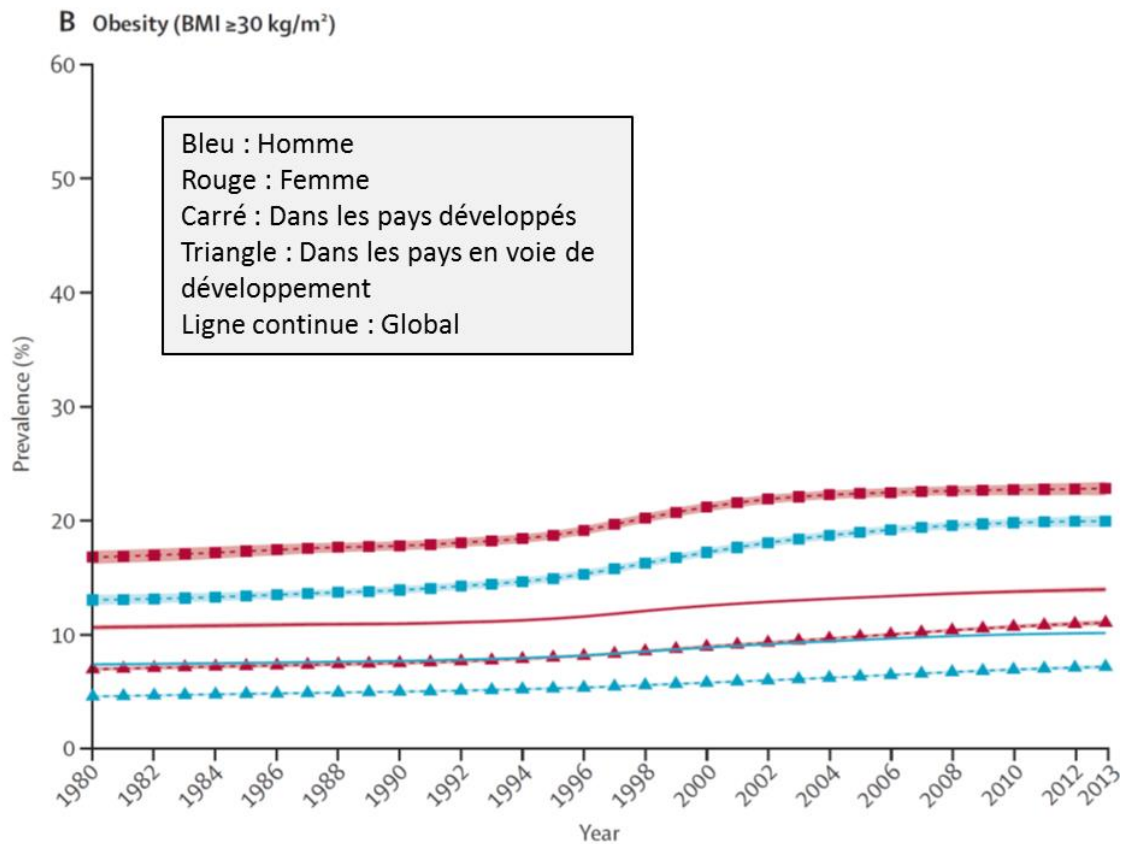


Figure 3 : Prévalence de l'obésité ($IMC \geq 30\ kg/m^2$) dans le monde chez les sujets de plus de 20 ans, par sexe et par niveau de développement du pays.

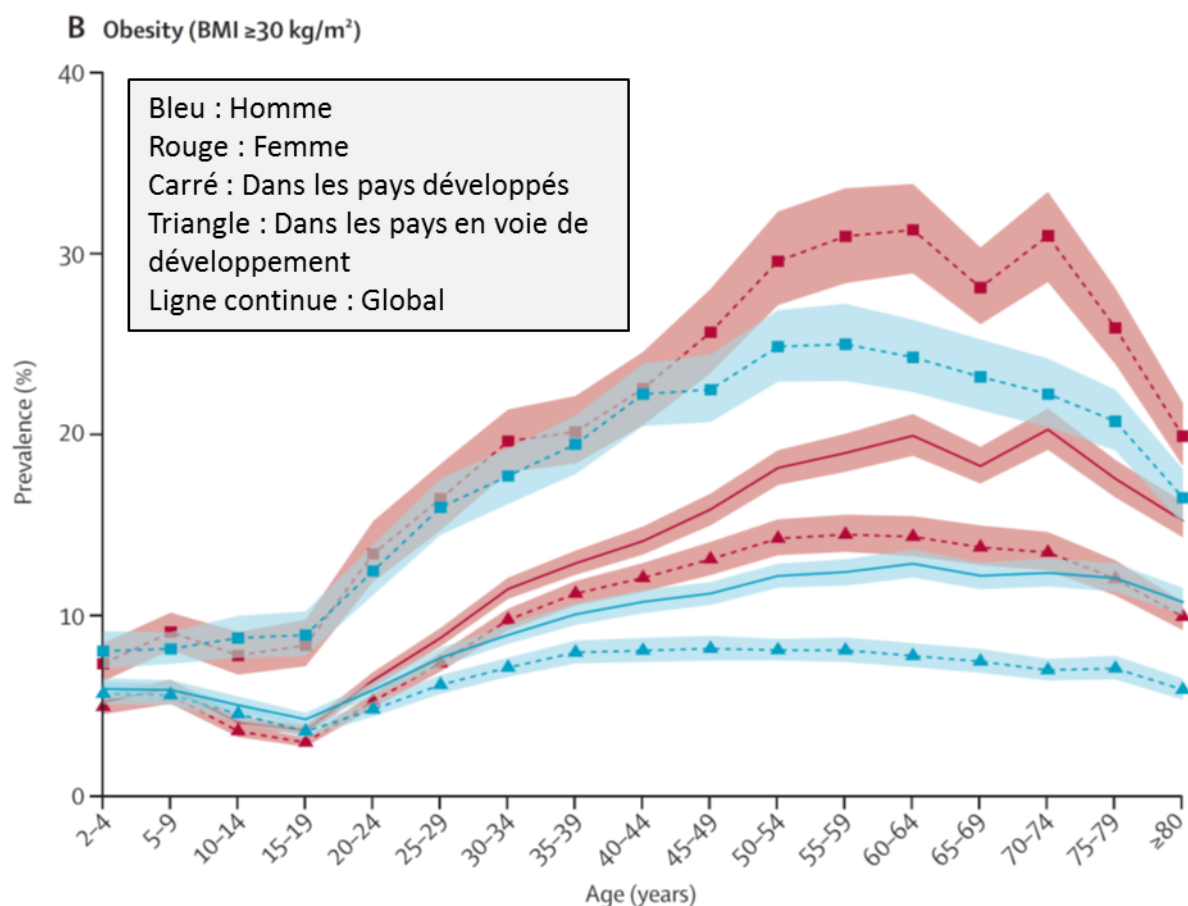


Figure 4 : Prévalence de l'obésité (IMC ≥ 30 kg/m²) dans le monde par sexe et par tranche d'âge.

D'un point de vue épidémiologique, l'augmentation de la prévalence de l'obésité est nette. Pourtant, il existe de nombreux systèmes de régulation de la balance énergétique, qui devraient permettre d'éviter l'augmentation du poids. En effet, la masse corporelle d'un individu varie avec une amplitude bien moindre que ces apports alimentaires.

Bien que ces apports alimentaires puissent être variables d'un jour à l'autre, de manière globale, un individu va adapter ses apports énergétiques alimentaires de manière inconsciente. Ce concept d'équilibre suit deux modèles, qui n'ont pas pu être départagés à l'heure actuelle : le modèle du « set point », qui signifie que le poids est régulé pour atteindre une valeur définie inconsciemment, et le modèle du « settling point », qui signifie que dans le temps, la balance entre les apports et les dépenses énergétiques atteint un état d'équilibre qui permet une stabilité pondérale¹¹.

La régulation de la masse corporelle est soutenue par les interactions entre les différents composants de la balance énergétique : l'énergie absorbée, l'énergie dépensée, l'énergie stockée, l'énergie dépensée au repos, l'énergie dépensée par l'activité. Suite à des variations de l'énergie stockée, la masse corporelle de l'individu varie également. Or, si l'énergie stockée augmente, l'augmentation de la masse corporelle entraîne une augmentation de l'énergie dépensée au repos, de l'énergie dépensée par l'activité (il faut plus d'énergie pour

déplacer un poids plus important), et ainsi, l'énergie dépensée augmente, contrebalançant l'augmentation d'énergie stockée. Le procédé inverse se produit également. Dans les deux cas, on constate que la variation d'énergie stockée est amortie par la variation des autres paramètres.

Les variations de ces différents paramètres ont également un impact sur le comportement inconscient de l'individu. En effet, la prise alimentaire régule la sécrétion de peptides spécifiques par le tube digestif. Ces peptides tels que la cholecystokinine ou la ghreline, sont capables de modifier la sensation de satiété et de faim au niveau du système nerveux central, permettant ainsi d'adapter la prise alimentaire en fonction de l'état énergétique du patient. Ce phénomène explique en partie que l'augmentation volontaire de l'Ed, dans l'optique de perdre du poids, tende à devenir inefficace, car l'individu finit par augmenter sa prise alimentaire de manière inconsciente.

Pourquoi alors, malgré ces systèmes de régulation, observe-t-on une augmentation de la prévalence de l'obésité à travers le monde depuis les années 1960 ?

Entre 1960 et 1980, la diminution de l'activité physique due à la modernisation des technologies a favorisé l'apparition de l'obésité dans les pays industrialisés. Mais depuis 1980, l'EDA n'a plus diminuée sensiblement, ce qui semble indiquer que le déséquilibre énergétique n'est pas dû à une diminution de l'activité, mais bien à une augmentation des apports.

Les systèmes de régulation de la masse corporelle vus ci-avant ne sont pas absolus. Du point de vue comportemental, il est à noter que le simple fait de prendre du plaisir en mangeant peut surpasser le signal de satiété envoyé par le tube digestif, ce qui engendre une prise alimentaire supérieure à ce qui est nécessaire à l'énergie des individus. Qui plus est, il suffit d'une différence d'ajustement de 0,5 % entre apports et besoins énergétiques au quotidien pour observer la prise de 1 kg par an⁸. Enfin, le déséquilibre énergétique, même s'il est compensé par les systèmes d'amortissement vus précédemment, génère une prise de poids par accumulation des graisses et une multiplication de la population adipocytaire. Un nouvel état d'équilibre s'installe alors, qui sera d'autant plus difficile à contrebalancer que la perte de poids ne s'accompagne pas d'une diminution de la population adipocytaire : celle-ci est donc disponible par la suite, et une nouvelle prise de poids n'en sera que plus aisée.

Chez les patients atteints d'obésité, on observe fréquemment le développement de comorbidités, pouvant pour certaines être regroupées dans ce que l'on nomme syndrome métabolique.

L'insulino-résistance est une des comorbidités associées à l'obésité. En effet, le dépôt de graisse favorise l'apparition d'une insulino-résistance pour plusieurs raisons. D'une part, l'augmentation du nombre d'adipocytes, population cellulaire très active au niveau endocrinien, entraîne une élévation des taux d'IL-1, d'IL-6, et de TNF α , qui sont des interleukines pro-inflammatoires. La dernière est également capable de diminuer la

sécrétion d'adiponectine, via un effet paracrine. Or, l'adiponectine sensibilise les cellules exprimant son récepteur à l'action de l'insuline. L'augmentation du nombre d'adipocytes diminue donc leur sensibilité à l'insuline⁸. D'autre part, l'accumulation de graisse se traduit par une augmentation de la concentration en triglycérides dans le plasma. Or, ces triglycérides sont le substrat énergétique préférentiel des muscles, qui consomment donc moins de glucose : la concentration en insuline plasmatique nécessaire pour stimuler l'absorption de glucose par les muscles s'en trouve alors augmentée. Qui plus est, l'infiltration de graisse dans le pancréas fragilise l'organe, et en particulier les cellules β des îlots de Langerhans, favorisant l'apparition d'une insulino-pénie.

L'obésité est donc un facteur de risque important dans le développement du diabète de type 2.

Parmi les autres comorbidités associées à l'obésité, on trouve les dyslipidémies⁸. Au niveau hépatique, l'obésité, en particulier abdominale, génère un afflux considérable d'acides gras et de cytokines pro-inflammatoires par la circulation porte, ce qui stimule la synthèse d'apolipoprotéine B, et de VLDL (Very Low Density Lipoprotein). Ce phénomène s'accompagne d'une augmentation de la concentration plasmatique en LDL, en particulier les particules de LDL petites et denses, qui sont fortement proathéromateuses. L'obésité favorise donc également l'apparition d'un phénomène d'athérosclérose, phénomène clé dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires.

On peut également citer dans les comorbidités associées à l'obésité l'hypertension artérielle¹², le développement d'arthrite (des genoux, des hanches, des articulations carpiennes et métacarpiennes) due à la fois à des causes biomécaniques, mais aussi au contexte pro-inflammatoire.

Environ 10 % des décès dus à un cancer chez les non-fumeurs sont liés à l'obésité⁸. Celle-ci favorise également le développement d'une stéato-hépatite non alcoolique, l'apparition de calculs biliaires, ...

La diminution de l'espérance de vie due à l'obésité, ainsi que l'ensemble des comorbidités associées, et l'augmentation constante de la prévalence, font de cette maladie un réel problème de santé publique. La problématique est d'autant plus importante que les moyens disponibles pour les professionnels de santé sont peu nombreux, limités dans leur efficacité, et parfois compliqués à mettre en place.

C. Epidémiologie et physiopathologie du syndrome métabolique.

Le syndrome métabolique, évoqué ci-avant, correspond à la présence chez un individu d'un ensemble de désordres physiologiques qui génère une augmentation du risque d'apparition de maladies cardiovasculaires et de diabète de type 2.

Plusieurs définitions existent et ne diffèrent que par certains détails. Voici l'une des plus communément acceptée, utilisée par le National Institute of Health (NIH) :

Un patient est diagnostiqué comme atteint d'un syndrome métabolique s'il possède au moins 3 des 5 critères suivants¹³ :

- Obésité abdominale : tour de taille supérieur à 102 cm chez l'homme, 88 cm chez la femme.
- Hypertriglycéridémie : [triglycéride]_{plasma} $\geq 1,7$ mmol/L
- Dyslipidémie : [HDL-cholestérol]_{plasma} < 40 mg/dL (homme), < 50 mg/dL (femme)
- Hypertension artérielle : pression artérielle $\geq 130/85$ mmHg
- Hyperglycémie à jeun : [glucose]_{plasma} $\geq 1,1$ g/L

Il a été démontré que plus un patient présentait de critères positifs, plus ses risques de développer une maladie cardiovasculaire ou un diabète de type 2 étaient grands. Ainsi, un patient regroupant 3 de ces 5 critères présente un risque deux fois plus élevé de développer une pathologie cardiovasculaire (apparition d'athérosclérose par exemple), et cinq fois plus élevé de développer un diabète de type 2¹³, d'où la nécessité de prendre en charge ce syndrome. Qui plus est, c'est une pathologie dont la prévalence est en augmentation dans de nombreuses populations, comme par exemple aux Etats unis, où 34,5 % de la population est concernée (entre 1999 et 2002), contre 23,7 % auparavant (entre 1991 et 1994)¹³.

C'est *a priori* dans les pays industrialisés que le syndrome métabolique est principalement présent, car le mode de vie sédentaire est un facteur de risque important de l'apparition des différents dérèglements. Le vieillissement et le stress, sont également des facteurs de risque du syndrome métabolique. Cependant, les pays émergents tels que l'Inde, la Chine ou le Brésil, sont aussi touchés par ce problème. Ainsi, 19 % de la population brésilienne était atteinte en 2000¹³.

Bien que le syndrome métabolique soit contesté en tant que « syndrome » à proprement parlé, ce concept présente des avantages dans le diagnostic et la prise en charge des patients développant des pathologies cardiovasculaires ou un diabète. L'un des intérêts du concept de syndrome métabolique est que les critères pris en compte pour celui-ci ne sont pas tous des critères classiquement utilisés dans l'évaluation des risques cardiovasculaires (activité physique, antécédents familiaux, taux de LDL cholestérol par exemple)¹³. Un autre intérêt est que le syndrome métabolique représente une opportunité de prendre en charge le diabète ou les maladies cardiovasculaires avant que celles-ci ne s'expriment cliniquement. Or, dans ces pathologies chroniques, plus la prise en charge est précoce, meilleurs sont les résultats. Ainsi, la prise en charge de patients prédiabétiques (*i.e.* intolérants au glucose) par un traitement par Metformine permet de diminuer d'un tiers l'incidence de diabète chez ces patients¹⁴.

Si j'ai choisi d'évoquer le syndrome métabolique, c'est parce que le récepteur TGR5, sujet de cette thèse, a un impact sur au moins 2 des 5 aspects qui composent ce syndrome. En effet, stimuler les voies de signalisation liées à TGR5 permettrait de diminuer la glycémie, et d'augmenter la dépense énergétique pour favoriser une diminution du poids.

D. Traitements actuels

Afin de positionner ces travaux dans un contexte de découverte de médicament, il me semble nécessaire de décrire le contexte thérapeutique actuel de ces maladies métaboliques, en détaillant bien sûr les traitements pharmacologiques, mais aussi les autres options disponibles pour le praticien, telles que les mesures hygiéno-diététiques ou la chirurgie.

1. Mesures hygiéno-diététiques

Comme nous venons de le voir, que ce soit pour le diabète de type 2 ou pour l'obésité, les patients atteints sont dans un état de déséquilibre énergétique, qui est en partie à l'origine de leur pathologie dont ils sont atteints. Dans ce contexte, la mise en place de quelque traitement que ce soit ne peut s'envisager que si des mesures visant à rééquilibrer apports et dépense énergétiques sont mises en place. Il s'agit ici d'informer le patient sur les répercussions que son régime alimentaire et son activité physique peuvent avoir sur sa santé, puis de mettre en place de nouvelles habitudes alimentaires, d'instaurer une activité physique régulière adaptée au patient, afin de s'opposer au déséquilibre énergétique.

Dans le cas de l'obésité, une perte de poids progressive et durable est recherchée, avec un objectif de 5% de perte de masse corporelle en un an. C'est d'ailleurs ce paramètre qui est actuellement utilisé comme critère principal d'évaluation par les agences d'évaluation des médicaments¹⁵ (Food and Drug Administration aux USA et European Medicine Agency en Europe).

Dans le cas du diabète de type 2, les mesures hygiéno-diététiques à instaurer sont très semblables à celles recommandées pour l'obésité. En effet, 80 % des patients diabétiques étant obèses, l'objectif est principalement la perte de poids, faible à modérée (environ 5 % du poids initial), mais à long terme. Les effets bénéfiques sont nombreux et ne se limitent pas au problème d'hyperglycémie, mais permettent aussi une amélioration des paramètres cardiovasculaires comme le profil lipidique par exemple¹⁶. Très peu d'effets indésirables sont à noter, et quoiqu'il en soit, le rapport bénéfice risque pour l'instauration de telles mesures est toujours en leur faveur.

Bien que potentiellement très puissantes dans la gestion de ces pathologies métaboliques, ces mesures possèdent une efficacité limitée, premièrement par la difficulté qu'éprouvent les patients à maintenir ces nouvelles habitudes de vie, et deuxièmement par la survenue de mécanismes de compensation, qui s'opposent en particulier à la perte de poids. Une intervention pharmacologique s'avère alors nécessaire, en supplément des mesures hygiéno-diététiques, qui doivent continuer d'être promues.

2. Traitements pharmacologiques du diabète de type 2

Les différents moyens de prendre en charge un patient diabétique ont pour but de diminuer la glycémie du patient. En effet, le traitement de l'hyperglycémie est une priorité car il permet de retarder l'apparition des complications du diabète¹⁷, en particulier les complications microvasculaires¹⁸.

Le traitement repose sur un suivi du diabète via 3 paramètres : la glycémie à jeun, la glycémie postprandiale (1 à 2 heures après le repas), et l'HbA_{1c}¹⁹ (Table 1).

Paramètres	Glycémie à jeun	Glycémie postprandiale	Hémoglobine A1c
Objectifs	0,7 à 1,3 g/L	< 1,8 g/L	< 7 %

Table 1 : paramètres biologiques du contrôle du diabète et leurs normes¹⁹

L'objectif recommandé par l'International Diabetes Foundation (IDF) est de maintenir l'HbA_{1c} en dessous de 7 %. Bien que le pourcentage normal d'HbA_{1c} soit inférieur à 6 %, aucune des thérapies actuelles n'a montré un bénéfice sur la morbi-mortalité à long terme lorsque le traitement était intensifié (dose journalière augmentée) pour atteindre l'objectif de moins de 6 % d'HbA_{1c}¹⁶. Au contraire, il a même parfois été observé une augmentation de la mortalité cardiovasculaire²⁰. C'est pourquoi les objectifs à atteindre ne sont pas absolus, mais au contraire doivent être adaptés au patient, en étant revus à la baisse ou à la hausse selon les résultats obtenus lors de la mise en place du traitement¹⁶.

Différentes classes thérapeutiques sont disponibles pour prendre en charge l'hyperglycémie chez le sujet diabétique, certaines anciennes, d'autres plus récentes. Un algorithme de traitement (Figure 5) a été généré suite à un consensus de spécialistes en diabétologie, et continue d'être mis à jour au fur et à mesure des avancées de la recherche¹⁶. Cet algorithme distingue les thérapies les plus anciennes pour lesquelles le recul clinique est conséquent, et les thérapies plus récentes, qui sont validées mais avec une expérience moindre sur le très long terme.

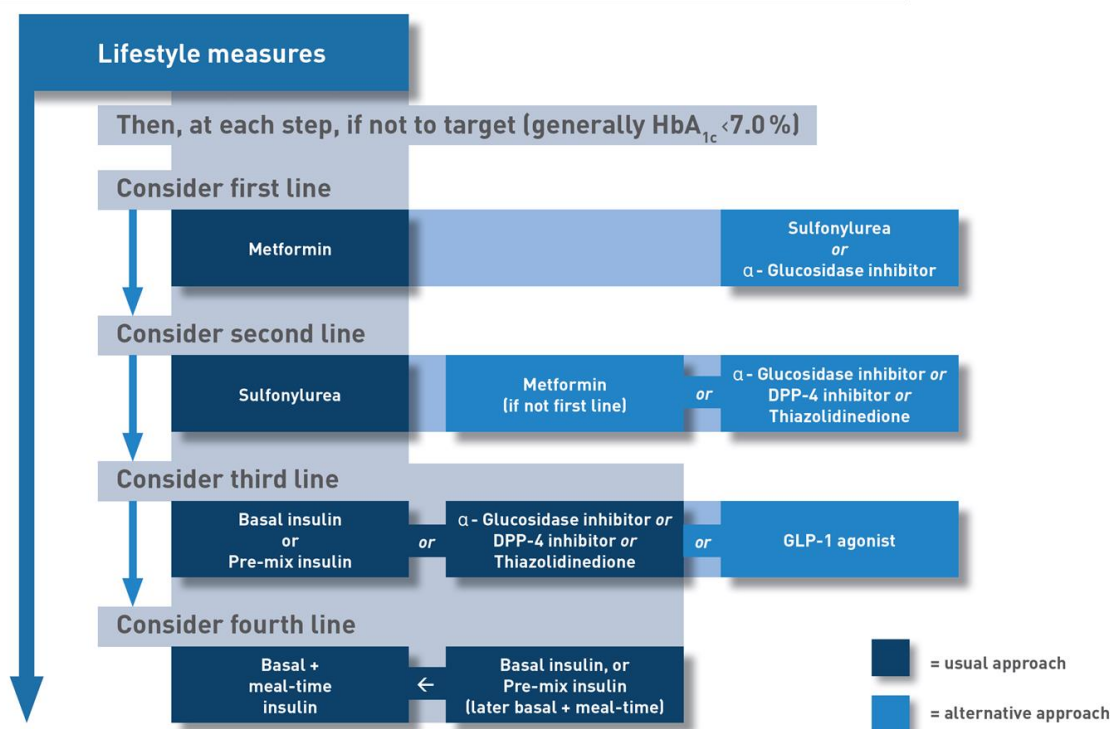


Figure 5 : algorithme de traitement des patients atteints de diabète de type 2¹⁶

Le clinicien dispose ainsi d'un arsenal thérapeutique lui permettant d'adapter le traitement aux particularités du patient. Les différents paramètres à prendre en compte sont :

- La puissance du contrôle glycémique à court et à long terme. En effet, si l'HbA_{1c} du patient est très élevée lors du diagnostic, il faudra opter pour un traitement puissant et efficace rapidement, alors que si l'HbA_{1c} est légèrement trop élevée, un traitement plus progressif et moins puissant suffit, les options plus agressives étant toujours disponibles si nécessaire.
- La sécurité et les effets indésirables potentiels, en particulier le risque d'hypoglycémie.
- La tolérance et l'observance attendues du patient.
- Les effets non glycémiques du traitement, en particulier l'impact sur le poids.

Détaillons maintenant les différentes classes thérapeutiques¹⁷ :

➤ La metformine.

Seul représentant de la famille des biguanides, la metformine possède trois niveaux d'action sur la glycémie : niveau digestif (diminution de l'absorption des sucres), niveau hépatique (diminution de la néoglucogenèse), niveau musculaire (augmentation de la captation du glucose en potentialisant l'effet de l'insuline : l'affinité de l'Insuline-Récepteur pour l'insuline est augmentée et la signalisation est facilitée). La metformine a surtout un impact sur la glycémie à jeun.

En monothérapie, elle permet une diminution d'environ 1,5 point de pourcentage de l'HbA_{1c}. L'effet sur le poids est nul, voire légèrement bénéfique (perte de poids). Le risque d'hypoglycémie est faible, même chez les patients prédiabétiques ayant une glycémie peu élevée. Les effets indésirables les plus fréquents sont des effets digestifs, non graves, mais qui peuvent diminuer l'observance. Le faible risque d'acidose lactique contre-indique son utilisation en cas d'insuffisance rénale (Clairance_{creatinine} < 30mL/min).

➤ Les sulfonylurées (sulfamides hypoglycémiant). Ex : Gliclazide

Cette classe de molécules se fixe sur des canaux potassiques ATP-dépendant (fixation à SUR = SulfonylUrea Receptor) et active leur fermeture, ce qui stimule la libération de l'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans. L'augmentation de la production d'insuline permet une meilleure régulation de la glycémie.

En monothérapie, les sulfonylurées permettent une diminution d'environ 1,5 point de pourcentage d'HbA_{1c}. Le risque d'hypoglycémie est conséquent, car la stimulation d'insuline est ici indépendante de la glycémie, et peut donc favoriser la diminution d'une glycémie normale, par exemple si le patient saute un repas. Il est également possible de développer des allergies cutanées, voire une photosensibilisation. On observe aussi en général une prise de poids d'environ 2 kg.

➤ Les Glinides. Ex : Répaglinide

C'est une famille apparentée aux sulfonylurées. Ils ont la même action sur la même cible, les canaux potassiques ATP-dépendant des cellules β des îlots de Langerhans, mais ne possèdent pas de fonction sulfamide.

Ils peuvent permettre d'obtenir une diminution de l'HbA_{1c} similaire à celle obtenue avec la metformine. La grosse différence avec les sulfonylurées est pharmacocinétique. La demi-vie des glinides est plus courte (1 h pour le répaglinide contre 12 à 20h pour le gliclazide), ce qui nécessite une prise plus fréquente, mais diminue le risque d'hypoglycémie, la prise s'effectuant en général 15 min avant chaque repas.

➤ Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase. Ex : Acarbose

L'alpha-glucosidase est une enzyme intestinale impliquée dans la digestion des dextrines et des disaccharides. L'objectif des inhibiteurs est de diminuer l'absorption intestinale des sucres. Ces inhibiteurs ont une biodisponibilité par voie orale nulle, et n'exercent donc qu'une action topique.

Ils permettent une diminution de 0,5 à 0,8 point de pourcentage de l'HbA_{1c}, et sont sans effet sur le poids. Bien que n'ayant aucun effet systémique, ils ne sont pas dénués d'effets indésirables, et en particulier, l'augmentation d'afflux de saccharides dans le côlon entraîne l'apparition de troubles digestifs et de flatulences qui, bien que bénins, sont à l'origine d'un

gros problème d'observance : 25 à 45 % des patients arrêtent leur traitement pour cette raison.

➤ Les thiazolidinediones. Ex : Pioglitazone

Les thiazolidinediones, appelées aussi glitazones, sont des agonistes des récepteurs PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor). Ces facteurs de transcription sont impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique. Ainsi, un agoniste des PPAR γ stimule l'expression du transporteur au glucose des muscles et du tissu adipeux, le GLUT4, et favorise le catabolisme du glucose en stimulant l'expression de la 6-Phosphofructo-2-kinase, enzyme de la glycolyse, et en réprimant l'expression de la fructose 2,6-diphosphatase, enzyme de la néoglucogénèse.

En monothérapie, elles permettent d'obtenir une baisse 0,5 à 1,4 point de pourcentage d'HbA_{1c}. De plus, l'activité de contrôle glycémique qu'elles exercent est moins rapide que celui des sulfonilurées, mais plus prolongée. Elles ont cependant de nombreux effets indésirables, comme la rétention hydrique accompagnée d'œdème, l'augmentation du risque de fracture osseuse (chez les femmes), le risque d'insuffisance cardiaque. La rosiglitazone, qui entraîne en plus un risque d'infarctus du myocarde, n'est d'ailleurs pas recommandée par ce consensus, elle a même été suspendue du marché européen. Quant à la pioglitazone, elle semble favoriser l'apparition de cancer de la vessie, et a d'ailleurs pour cela été retirée du marché français. C'est une classe thérapeutique qui tend à s'effacer au profit de nouvelles options plus sûres.

➤ Agonistes de l'amyline. Ex : Pramlintide

L'amyline est une hormone peptidique sécrétée par les cellules β des ilots de Langerhans. Elle ralentit la vidange gastrique, diminue la production de glucagon glucose-dépendante, et favorise la sensation de satiété. Les agonistes synthétiques permettent de reproduire ces effets.

Ainsi, le pramlintide est capable de diminuer de 0,5 à 0,7 point de pourcentage l'HbA_{1c}. Le principal effet indésirable est l'apparition de nausée à l'initiation du traitement. Celles-ci ont tendance à s'estomper par la suite. On observe également un effet positif sur le poids, qui peut être expliqué en partie par l'effet émétique. C'est un médicament approuvé en 2005 aux Etats-Unis, et qui n'est pas commercialisé ailleurs.

Le pramlintide est administré par voie injectable sous-cutanée uniquement.

➤ Analogues du GLP-1. Ex : Exenatide

Le GLP-1 est une hormone peptidique de la famille des incrétines, sécrétée par les cellules entéroendocrines L de l'intestin. Cette hormone est notamment capable de stimuler la sécrétion d'insuline glucose-dépendante, de ralentir la vidange gastrique, ou encore de favoriser la sensation de satiété. Nous reviendrons plus en détail sur la voie incrétine par la

suite. Les analogues thérapeutiques de cette hormone produisent les mêmes effets que l'hormone naturelle, mais sont beaucoup moins sensibles à l'enzyme qui dégrade cette hormone, la DiPeptidylPeptidase IV (DPP4).

On peut obtenir avec ces traitements une diminution de 0,5 à 1 point de pourcentage de l'HbA_{1c}. Il n'y a pas de risque d'hypoglycémie avec ces composés. Les effets indésirables principaux sont les diarrhées, nausées et vomissements, à l'initiation du traitement. On observe en général une perte de poids de 2 à 3 kg après les six premiers mois de traitement. L'exénatide est suspecté d'entraîner des risques de pancréatites, mais aucune relation causale n'a encore été établie.

➤ Inhibiteurs de la DPP4. Ex : Sitagliptine

Ces composés, en inhibant l'enzyme responsable de la dégradation du GLP-1, favorisent l'action de celui-ci.

On obtient ainsi des réductions de 0,6 à 0,9 point de pourcentage de l'HbA_{1c}. Il n'y a pas avec ces traitements de risques d'hypoglycémie, ni d'effet sur le poids. Ils pourraient induire des risques d'infections respiratoires. En effet, la DPP4 est exprimée à la surface de certaines cellules immunitaires, et son inhibition pourrait avoir un impact sur l'immunité.

➤ Inhibiteurs de SGLT-2. Ex : Canagliflozine

Le Sodium-Glucose Transporter 2 est une protéine transmembranaire exprimée uniquement au niveau rénal et permettant la réabsorption active du glucose filtré par le glomérule vers le sang, au niveau du tube contourné proximal²¹. Plusieurs inhibiteurs de ce transporteur ont récemment obtenu leur autorisation de mise sur le marché, suite à de bons résultats lors des essais cliniques.

Ces molécules sont capables de générer une baisse du pourcentage d' HbA_{1c} de 0,3 à 1 point de pourcentage. De plus, de par leur mécanisme insuline-indépendant, le risque d'hypoglycémie est faible. Cette nouvelle classe pharmaceutique présente qui plus est un effet intéressant de réduction du poids dû à une excrétion rénale du glucose augmentée. La glycosurie constante chez les patients traités s'accompagne cependant d'un risque augmenté d'infections génitales, sans toutefois avoir un impact fort sur le suivi du traitement²¹.

➤ Insulines

Les insulines sont le traitement le plus efficace et le plus adaptable de l'hyperglycémie. Il existe plusieurs types d'insuline, qui varient selon leur pharmacocinétique. Certaines insulines ont une action très brève et intense, tandis que d'autre une action très prolongée et régulière.

En adaptant les doses, il est possible d'atteindre l'objectif de 7 % d'HbA_{1c} quel que soit le statut du patient. Cependant, l'utilisation de l'insuline, qui est aussi un facteur de croissance auquel sont sensibles les adipocytes, génère une prise de poids proportionnelle à la réduction de la glycémie. Des épisodes d'hypoglycémie peuvent également survenir. L'insuline a également un impact intéressant sur le profil lipidique puisqu'elle permet une diminution des triglycérides et une augmentation du HDL cholestérol (High density Lipoprotein).

Il est à noter qu'à l'exception de l'insuline inhalable Afrezza®, toutes les insulines actuellement sur le marché sont uniquement en voie injectable, sous-cutanée le plus souvent. Ce mode d'administration reste un inconvénient, malgré les progrès réalisés en termes de simplicité d'utilisation, de sécurité et de confort.

3. Traitements de l'obésité

a) Traitements pharmacologiques

Comme nous l'avons vu précédemment, la perte de poids et le maintien d'un poids plus faible sont des objectifs d'autant plus difficiles à atteindre qu'il existe des systèmes de compensation à long terme de l'effort réalisé, à la fois mécaniques et psychologiques. C'est parce que cette perte de poids est difficile à inscrire sur la durée qu'une intervention pharmacologique peut se révéler nécessaire.

Malheureusement, l'arsenal thérapeutique disponible est restreint, suite aux nombreux retraits du marché des médicaments qui étaient indiqués dans la prise en charge de l'obésité. Une nouvelle vague de thérapie émerge cependant depuis les trois dernières années.

➤ Ainsi, la phentermine, et la fenfluramine, dérivés de l'amphétamine, ont longtemps été associées pour favoriser la perte de poids aux Etats-Unis, mais suite à des risques de valvulopathies observés chez près de 30 % des patients sous fenfluramine, celle-ci a été retirée du marché en 1997. La phentermine est encore autorisée aux Etats-Unis, pour de courtes interventions de 12 semaines maximum. Cet analogue de la métamphétamine agit en diminuant l'appétit via son impact sur le système nerveux central.

➤ En 1997 aux USA et 1999 en Europe est approuvée la sibutramine, un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, qui permet lui aussi une diminution de l'appétit. Suite à l'apparition de risques d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux, elle a été retirée du marché en 2010.

➤ Le Rimonabant a été approuvé en 2006 en Europe. C'est un antagoniste des récepteurs aux cannabinoïdes CB1, qui agit en diminuant le désir de prise alimentaire du patient, via son impact sur le circuit de la récompense. Mais suite à des risques de troubles psychiatriques, la dépression notamment, il a été suspendu en 2008.

➤ L'orlistat a été approuvé en 1998 en Europe et 1999 aux USA dans le traitement à long terme de l'obésité. Contrairement aux autres traitements vus ci-avant, il n'agit pas sur le comportement alimentaire. L'orlistat est un inhibiteur de la lipase gastro-intestinale. A dose thérapeutique, près de 30 % des lipides ingérés ne sont ni digérés ni absorbés par le tractus digestif. Cet effet s'accompagne d'effets indésirables digestifs qui s'atténuent avec le temps, tels que des écoulements huileux au niveau anal, des flatulences, des défécations plus fréquentes, parfois impérieuses, ... Bien que son efficacité soit variable selon les patients, cette thérapie permet, en plus d'une diminution de la masse corporelle, d'obtenir des effets positifs sur certaines comorbidités associées à l'obésité, notamment le diabète et les dyslipidémies²².

➤ La Lorcaserine a été approuvée en 2013 aux Etats-Unis, mais sa demande d'AMM a dernièrement été retirée en Europe. C'est un agoniste des récepteurs sérotoninergiques de type 2C (5-HT_{2C}) qui possède donc une activité hypophagique. Sa relative sélectivité vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{2A} et 5HT_{2B} la rend plus sûre d'utilisation que le fenfluramine, malgré un mécanisme d'action analogue au niveau central. Bien qu'efficace dans l'induction de la perte de poids en début de traitement, les essais cliniques indiquent une possible tolérance à la lorcaserine accompagnée par une reprise de poids malgré la poursuite du traitement¹⁵.

➤ L'association Phentermine/Topiramate a été mise sur le marché aux USA en septembre 2012. La phentermine vue ci-avant est ici associée à un anti-épileptique dont l'effet sur la perte de poids a été observé chez certains patients épileptiques, bien que le mécanisme induisant cette perte de poids ne soit pas connu. L'association de ces deux molécules permet de les utiliser à des doses inférieures aux doses individuelles requises pour induire une perte de poids. C'est à l'heure actuelle le traitement le plus efficace de l'obésité, avec une perte de poids d'environ 10% à deux ans, chez les patients traités à la plus haute dose²³. Des précisions sur l'impact cardiovasculaire de ce traitement seront apportées par un essai clinique en cours. Le caractère tératogène du topiramate nécessite une gestion efficace et validée de la contraception chez les femmes qui se voient prescrire cette association¹⁵.

➤ L'association Bupropion/Naltrexone combine deux composés à action centrale. Elle est approuvée aux USA depuis 2014, et en Europe depuis 2015. Le bupropion, utilisé dans le traitement de la dépression et le sevrage tabagique, est un inhibiteur non sélectif des transporteurs à la dopamine et à la noradrénaline, dont l'ensemble des effets pharmacologiques est encore mal connu, et qui est peu efficace en monothérapie dans le traitement de l'obésité. Son association à la Naltrexone, un antagoniste des récepteurs opioïdes utilisé dans le traitement des dépendances à l'alcool et aux opiacées, permettrait une activation synergique des neurones à Pro-opiomélanocortine (POMC), capable d'induire un effet anorexigène par la sécrétion d'une hormone peptidique (l' α -Melanocyte-Stimulating Hormone ou α -MSH).

➤ Agonistes peptidiques du GLP-1 R. Ex : Le liraglutide

Comme vu précédemment, les agonistes peptidiques du récepteur au GLP-1 sont des activateurs de la voie incrétine. Leur capacité à induire une perte de poids chez les patients atteints de diabète de type 2 est également valable chez les patients obèses, diabétiques ou non²⁴. Ainsi, le liraglutide (3.0 mg, en injection sous-cutanée) a été récemment approuvé en Europe et aux USA dans le traitement de l'obésité (à une dose supérieure à la dose prescrite pour le traitement du diabète de type 2).

b) Traitements chirurgicaux

La chirurgie est également un moyen de prendre en charge l'obésité. Elle consiste en général à diminuer la taille de l'estomac afin de réduire la prise alimentaire. Les résultats sur la perte de poids sont très intéressants, avec en moyenne entre 25 et 30 % par rapport à la masse corporelle initiale, pour moins de 1 % de mortalité lors de l'acte chirurgical⁸. On peut également observer une normalisation des paramètres comme la tension artérielle ou la glycémie chez des sujets hypertendus ou diabétiques. Elle reste cependant réservée aux cas plus sévères (IMC ≥ 40 ou IMC ≥ 35 associé avec une comorbidité liée au poids),

4. Conclusions sur les traitements du diabète et de l'obésité

Comme nous venons de le détailler, la mise en place et le maintien de mesures hygiéno-diététiques est crucial dans la prise en charge de ces deux pathologies issues d'un désordre métabolique. Cependant, le désordre métabolique étant souvent lié à de mauvaises habitudes de vie, ancrées chez le patient depuis plusieurs années voire dizaines d'années, le suivi de nouvelles lignes de conduite est difficile, et a tendance à s'estomper au cours du temps. C'est pourquoi le recours à une thérapie pharmacologique permettant de maximiser l'effet de ces mesures hygiéno-diététiques, ou tout simplement de maintenir le résultat obtenu, est fréquemment nécessaire.

Dans le cadre de l'obésité, même si plusieurs médicaments ont récemment reçu leur Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), les options thérapeutiques restent limitées, en termes de diversité de choix, et d'efficacité sur la perte de poids. De plus, les effets de ces nouvelles thérapies sur la morbi-mortalité associée à plus long terme sont encore inconnus. Il est d'ailleurs important de noter que les critères d'efficacité utilisés par les agences d'évaluation sont eux aussi limités, car ils ne prennent en compte que la diminution de la masse corporelle, sans s'attarder sur l'impact réel du médicament sur d'éventuelles complications à long terme.

Dans le cadre du diabète, l'arsenal thérapeutique est constitué de 9 classes thérapeutiques (insulines exclues) différant par leur mode d'action, leur efficacité à diminuer l'hyperglycémie, leurs effets non-glycémiques, et le recul sur leur utilisation à long terme. Malgré cette relative diversité, les traitements antidiabétiques s'avèrent insuffisants, comme l'indique la nécessité du recours à l'insuline chez de nombreux patients, chez qui aucun autre traitement ne permet plus d'atteindre un contrôle glycémique satisfaisant.

Une des raisons potentielles de cet échec est que la majorité de ces traitements visent à normaliser un paramètre biologique (la glycémie), mais ne s'attaquent pas au déséquilibre métabolique sous-jacent. La récente approbation d'analogues du GLP-1 dans le traitement de l'obésité tend à montrer que cette classe est au contraire capable d'agir sur ce déséquilibre.

Quelles sont donc les particularités biologiques qui font de la voie incrétine une cible intéressante dans la prise en charge de désordres métaboliques ?

E. Focus sur la voie incrétine

1. Généralités

Il existe une différence de réponse de l'organisme à l'administration de glucose, selon que celle-ci est orale ou intraveineuse, même lorsqu'elles entraînent une glycémie identique²⁵. En effet, la production d'insuline sera bien plus importante lorsque le glucose a été administré *per os*. Or, le mécanisme de contrôle de la sécrétion d'insuline est sous la dépendance de la glycémie. Il existe donc un système capable de potentialiser la sécrétion d'insuline. Ce système correspond à ce qui a été nommé hormones incrétines.

Ce système endocrine relie l'intestin à de nombreux autres organes, via deux médiateurs principaux, le Glucagon-Like-Peptide-1 (GLP-1) et le Glucose-dépendant-Insulino-tropique-Polypeptide (GIP).

Le GIP tout d'abord, est un peptide de 42 acides aminés, produit par les cellules entéroendocrines K du duodénum, en réponse directe au passage du bol alimentaire. Sa demi-vie courte est à la fois due à l'élimination rénale et à la dégradation par la DiPeptidylPeptidase4 (DPP4), qui clive le GIP après l'Alanine en position 2²⁵.

Le GLP-1 quant à lui, est un peptide dérivé du Proglucagon, peptide également précurseur du glucagon. Ce propeptide est clivé par la prohormone convertase 1/3 (PC 1/3) pour obtenir le GLP-1(1-37), lui-même à nouveau clivé pour donner les GLP-1(7-37) et GLP-1(7-36)amide, qui sont les deux formes actives équipotentes du GLP-1 (la 2^{nde} étant majoritaire)²⁵. Pour plus de commodité, le terme GLP-1 désignera par la suite les formes actives (7-37) et (7-36)amide indépendamment. Le GLP-1 est produit par les cellules entéroendocrines L surtout présentes dans l'iléon et dans le côlon. Cette sécrétion a lieu en réponse à la prise alimentaire. Plusieurs stimuli sont connus pour entraîner la sécrétion de GLP-1. Ces signaux peuvent être de nature hormonale (GIP) ou neuronale. La présence luminale des nutriments, et leur absorption par les cellules entéroendocrines, sont également des déclencheurs de la sécrétion de GLP-1. L'importance relative de ces stimuli sur le contrôle de la sécrétion de GLP-1 n'est cependant pas encore clairement établie²⁶. Tout comme le GIP, le GLP-1 a une demi-vie courte ($t_{1/2} = 1$ à 2 min), de par son élimination rénale et sa sensibilité à la dégradation par la DPP4.

2. Effets du GLP-1

Le GLP-1 exerce ses effets sur les différents tissus cibles (Figure 6) via la fixation sur son récepteur, le GLP1-R. Ce récepteur couplé aux protéines G (RCPG) est exprimé à la surface de nombreux tissus tels que les îlots pancréatiques, le rein, le cœur, le système nerveux central et périphérique. Dans les îlots, il est surtout présent sur les cellules β , mais également sur les cellules α et δ ²⁵.

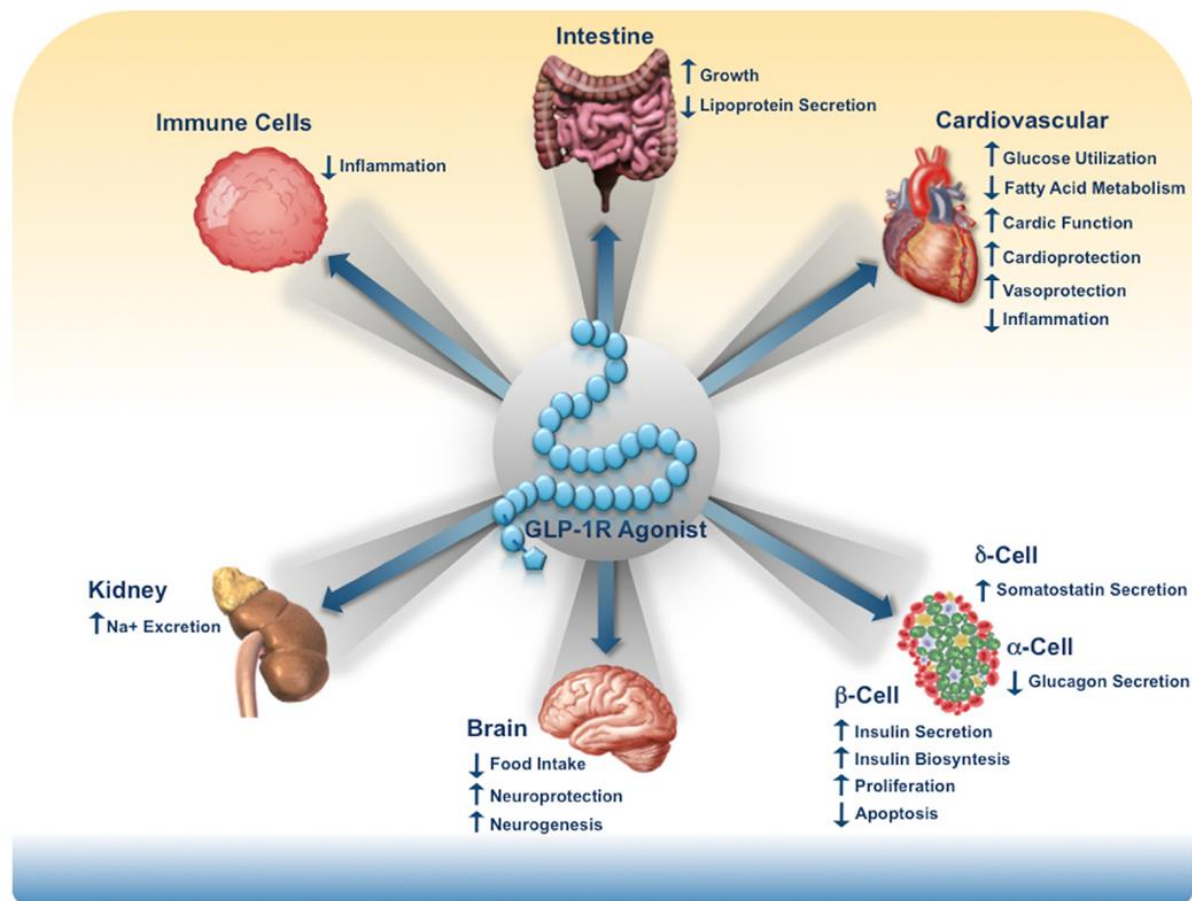


Figure 6 : Action pharmacologique directe des agonistes du récepteur au GLP-1²⁶

Au niveau des cellules β , l'action du GLP-1 va être de deux natures : glucodépendante et glucoindépendante.

➤ Glucodépendante : le GLP-1 potentialise l'effet d'une glycémie élevée sur la sécrétion d'insuline. En d'autres termes, le GLP-1 augmente la libération et la synthèse d'insuline par ces cellules.

La première étape de la transduction du signal est l'activation de l'adénylyl cyclase lors de la fixation du GLP-1 sur son récepteur (GLP1-R). L'augmentation de la concentration en Adénosine Monophosphate cyclique (AMPC) active entre autre la Protéine Kinase A (PKA), et l'AMP Guanine nucleotide Exchange Factor II (Epac2), toutes deux impliquées dans la stimulation de la libération d'insuline²⁷.

La synthèse de l'insuline est également favorisée, via l'augmentation de la transcription du gène correspondant, ainsi que via l'augmentation de la stabilité de son ARNm. Cet effet est connu pour être AMPc-dépendant PKA-indépendant, et passerait par la stimulation par le GLP-1 de la synthèse de Pdx1, un facteur de transcription capable d'activer la transcription du gène de l'insuline²⁵.

Le GLP-1 agit aussi sur la libération de glucagon, qu'il diminue à la fois directement en activant les GLP1-R à la surface des cellules α , mais aussi indirectement via des effets paracrines, en agissant sur les cellules β et δ ²⁶.

➤ Glucoindépendante : le GLP-1 favorise le profil endocrine des cellules β .

Comme nous l'avons vu ci-dessus, le GLP-1 active la transcription de Pdx1, qui favorise la synthèse d'insuline. Mais le GLP1-R est également capable d'activer la transcription de GLUT2, transporteur de la membrane plasmique du Glucose dans ces cellules, et celle de glucokinase, première enzyme dans le catabolisme du Glucose. Ces deux protéines jouent un rôle important dans la détection des variations de la glycémie par les cellules des îlots pancréatiques²⁵.

Via l'activation par la PKA de CREBP (cAMP Respons Element Binding Protein), le GLP1-R favorise aussi la prolifération et inhibe l'apoptose des cellules β ²⁶.

➤ Autres effets du GLP1 :

La diversité des organes et des types cellulaires exprimant le récepteur au GLP-1 est à l'origine d'une grande variété dans les effets physiologiques des agonistes GLP-1. Tous ne sont pas clairement établis, et leur relevance clinique est parfois limitée. Il me semble toutefois important de citer quelques uns d'entre eux, afin d'illustrer cette diversité.

D'un point de vue métabolique, il est important de noter que le GLP-1 ralentit la vidange gastrique, en influant sans doute sur l'innervation vagale de l'estomac. Cet effet a pour conséquence de mieux répartir dans le temps l'absorption des nutriments, en particulier du glucose, et de diminuer ainsi le pic glycémique post prandial²⁵. De plus, le GLP-1 diminue l'appétit, et favorise la perte de poids. Des GLP1-R ont été localisés au niveaux de noyaux hypothalamiques jouant un rôle dans le contrôle de la satiété²⁵.

Au niveau cardiaque, des agonistes GLP-1 entraînent une augmentation du rythme cardiaque et de la pression artérielle. Il est intéressant de faire remarquer que le GLP-1 conserve son effet protecteur cellulaire et anti-apoptotique sur les cellules cardiaques, ce qui peut par exemple s'avérer bénéfique en cas d'infarctus du myocarde²⁵.

Les agonistes GLP-1 sont également dotés de propriétés anti-inflammatoires, observées en particulier au niveau cérébral, pancréatique, et cardiovasculaire, qui se traduisent par des effets protecteurs sur les organes concernés²⁶.

3. La voie incrétine et son utilisation en thérapeutique

Comme nous venons de le voir, le GLP-1 a de nombreuses actions favorables à un meilleur contrôle glycémique :

- Il favorise la sécrétion d'insuline,
- Diminue la sécrétion de glucagon
- Ralentit la vidange gastrique
- Augmente la sensation de satiété
- Favorise la multiplication de la population β au niveau du pancréas.

L'ensemble de ces effets explique l'intérêt des thérapies antidiabétiques incrétinomimétiques et incrétinopotentiatrices. En mimant le GLP-1, ou en inhibant la DPP4, on peut reproduire et potentialiser artificiellement ces effets bénéfiques dans la prise en charge du diabète. Il est important de noter que les deux effets pro et antisécrétoire (vis-à-vis de l'insuline et du glucagon, respectivement) sont glycémie-dépendants, diminuant ainsi le risque d'hypoglycémie. En effet, en présence d'une glycémie ne nécessitant pas la libération d'insuline, le GLP-1 sera incapable d'entraîner cette libération par les cellules β . L'effet sur la vidange gastrique et la sensation de satiété est également très positif chez les sujets en surpoids, ce qui s'est d'ailleurs récemment traduit par l'approbation du liraglutide dans le traitement de l'obésité.

Comme cela a été évoqué précédemment, la présence dans la lumière intestinale de certains composés, comme des nutriments par exemple, est un des déclencheurs de la sécrétion de GLP-1 par les cellules entéroendocrines L. Cependant, les nutriments ne sont pas les seules molécules capables de générer un tel effet. Ainsi, les acides biliaires sont également connus pour augmenter la sécrétion de GLP-1, via l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G, le récepteur TGR5²⁸. Je vais donc maintenant détailler l'état de l'art concernant la biologie, la pharmacologie, et le potentiel thérapeutique de ce récepteur.

II. Le récepteur TGR5

Le récepteur TGR5 (Takeda G-protein coupled Receptor 5), aussi dénommé GPBAR-1 (G-Protein coupled Bile Acids Receptor) est un récepteur membranaire, identifié en 2002-2003 par deux équipes différentes, comme étant sensible aux acides biliaires^{2,3}.

Avant de détailler la caractérisation du récepteur TGR5, il me semble nécessaire de décrire les agonistes naturels de ce récepteur : les acides biliaires.

A. Généralités sur les acides biliaires

L'homéostasie du cholestérol est un équilibre entre l'apport alimentaire, la synthèse endogène, et son catabolisme, qui se termine notamment par la synthèse d'acides biliaires. Constitutivement, l'organisme synthétise plusieurs acides biliaires de structures légèrement différentes : l'acide cholique et l'acide chenodeoxycholique, qui sont les acides biliaires primaires. La métabolisation de ces acides biliaires par les bactéries intestinales donne les acides deoxycholique et lithocholique (par deshydroxylation en 7), qui sont les acides biliaires secondaires. Acides biliaires primaires et secondaires peuvent être conjugués à diverses molécules, en particulier à des acides aminés tels que la taurine ou la glycine (Figure 7).

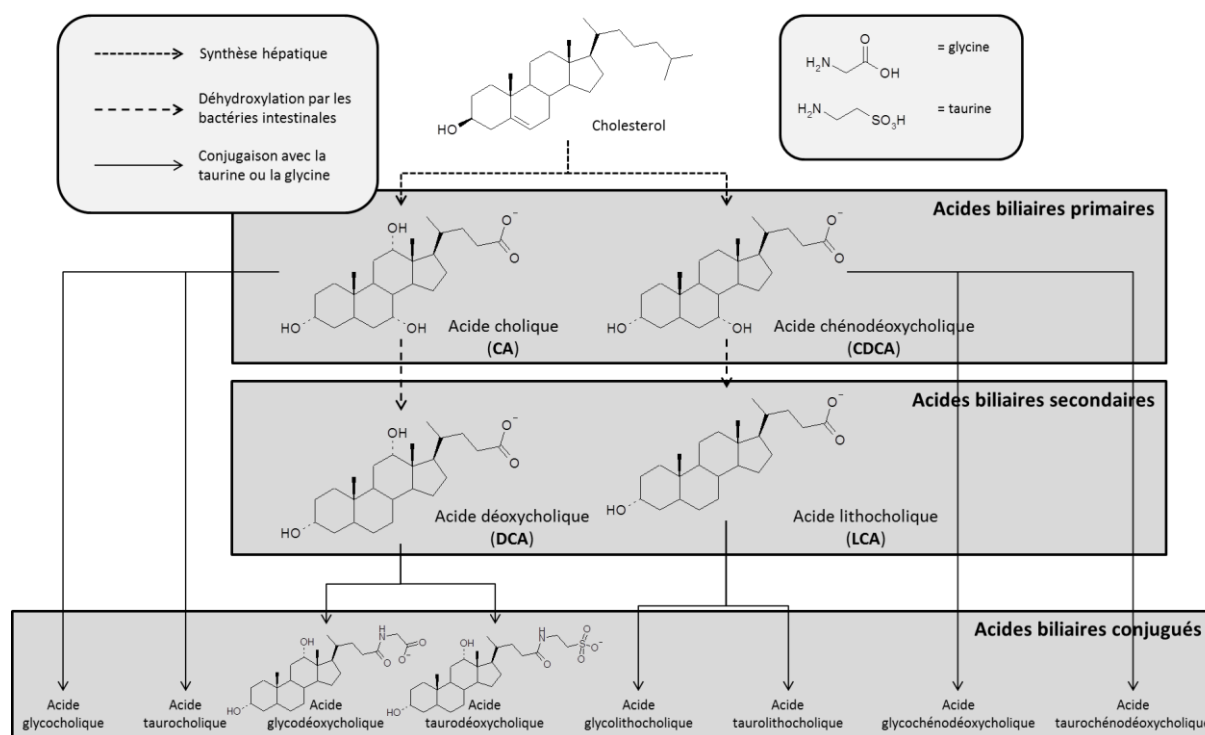


Figure 7 : voie de synthèse des principaux acides biliaires

La structure chimique des acides biliaires leur donne des propriétés amphiphiles (Figure 8) qui permettent à ces molécules de jouer un rôle primordial dans l'absorption des lipides et des vitamines liposolubles : ils agissent comme des tensioactifs et permettent ainsi la

solubilisation de ces nutriments sous forme de micelles dans le tractus intestinal. Ils sont en effet le constituant principal de la bile, sécrétion hépatique déversée dans le duodénum lors de la digestion. Il est important de noter que seuls 5 % des acides biliaires sécrétés dans le duodénum sont excrétés dans les fécès. Les 95 % restants sont réabsorbés par l'iléon, et subissent ce que l'on nomme un cycle entéro-hépatique, afin d'être réutilisés par la suite.

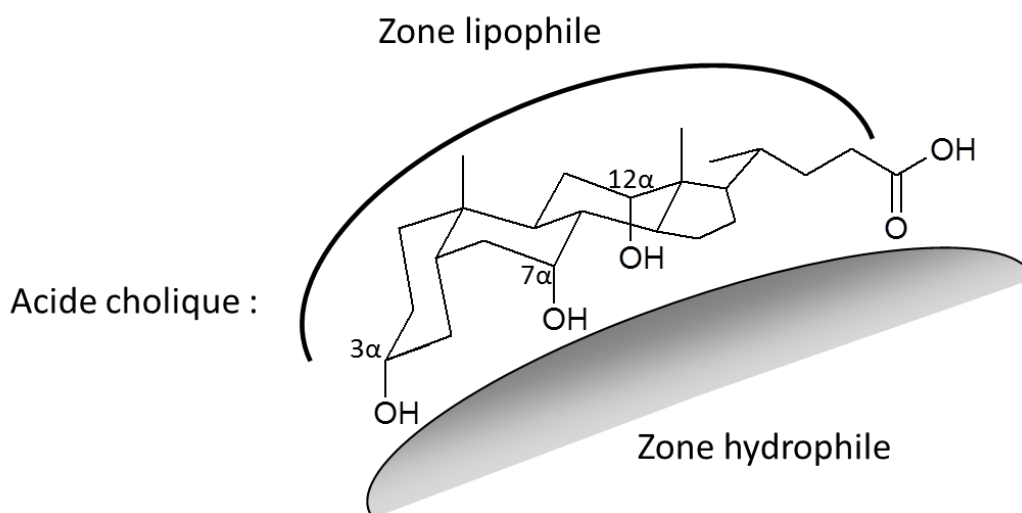


Figure 8 : structure et polarité de l'acide cholique

Outre leur propriétés tensioactives, il a été découvert à la fin des années 90 que les acides biliaires étaient dotés de fonctions de signalisation. Ainsi, en 1999, le récepteur nucléaire FXR (pour Farnesoid X receptor) a été identifié comme étant une des cibles des acides biliaires²⁹, en particulier de l'acide chénodeoxycholique (CDCA). Le récepteur FXR est un facteur de transcription et module donc l'expression de certains gènes, en particulier certains gènes impliqués dans l'homéostasie des acides biliaires. Ainsi, l'activation du FXR par le CDCA entraîne l'inhibition de la transcription du gène codant pour la cholestérol-7- α hydroxylase, enzyme limitante dans la synthèse des acides biliaires²⁹.

Plus récemment, il a été montré que les propriétés de signalisation des acides biliaires étaient plus étendues que l'effet sur leur propre homéostasie.

En 2002-2003, deux équipes ont montré que les acides biliaires pouvaient activer un récepteur couplé aux protéines G de classe 1 (famille des récepteurs Rhodopsin-like) dont le gène est répertorié dans la GenBank™ database sous le code AC021016. Ce récepteur a été nommé Membrane Bile Acide Receptor (M-BAR), GPBAR-1, ou encore TGR5^{2,3}.

B. Caractérisation

TGR5 est une protéine exprimée chez de nombreux mammifères et dont la séquence est bien conservée entre les espèces². Ainsi, le TGR5 humain conserve 86 % d'identité avec le TGR5 du bœuf, 80 % avec celui du lapin, 82 % avec celui du rat, et 83 % avec celui de la

souris. Bien qu'appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G de type Rhodopsin-like, il est considéré comme un membre à part, du fait de son faible pourcentage d'identité avec le reste de cette famille (moins de 34%)³⁰.

Sa caractérisation a permis d'identifier des ligands potentiels, d'évaluer son niveau d'expression dans différents tissus, voire dans différentes lignées cellulaires, d'étudier les voies de signalisations qui lui sont associées, et de proposer des hypothèses sur son rôle physiologique.

1. Ligands endogènes de TGR5

L'évaluation de plusieurs centaines de composés pour leur capacité à induire une modification TGR5-dépendante de la concentration intracellulaire en AMPc ou en calcium (Ca^{2+}) a permis d'identifier les acides biliaires comme étant les ligands endogènes de TGR5^{2,3}. Parmi les dérivés stéroïdiens testés, seule la prégnandione s'est également révélée active, contrairement à la corticostérone ou au cholestérol³ (Figure 9), illustrant l'importance de la configuration *cis* de la jonction de cycle entre les cycles A et B du noyau stérane, avec l'hydrogène porté par le carbone 5 en β , spécificité structurale communes aux acides biliaires.

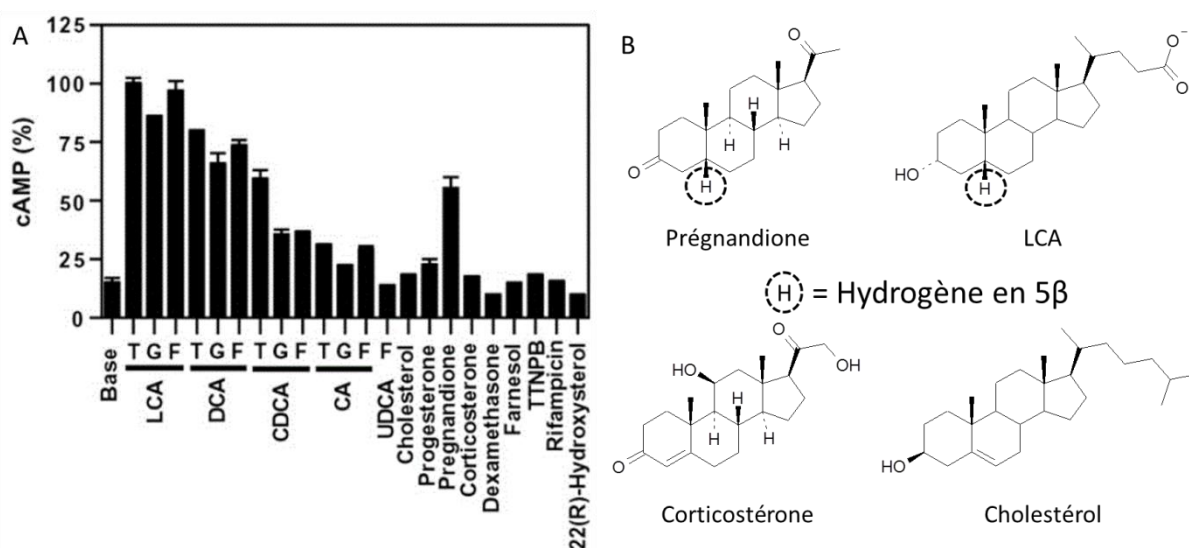


Figure 9 : A : Activation de la production d'AMPc dans des cellules CHO exprimant TGR5. Les composés ont été testés à la concentration de $2 \mu\text{M}$.

B : Structure de la prégnandione, de l'acide lithocholique (LCA), de la corticostérone et du cholestérol.

Des courbes dose-réponse ont été réalisées afin de classer les acides biliaires en fonction de leur puissance d'activation de TGR5³ (Figure 10). L'ordre de puissance est le suivant : $\text{LCA} > \text{DCA} > \text{CDCA} > \text{CA}$, avec des EC_{50} de $0,53 \mu\text{M}$, $1,01 \mu\text{M}$, $4,43 \mu\text{M}$, et $7,72 \mu\text{M}$ respectivement (plus l' EC_{50} est faible, plus le composé est affin, puissant, pour sa cible). On constate que plus les acides biliaires sont hydrophobes, plus l'affinité est importante. Le LCA est d'ailleurs un des composés de référence dans les tests pharmacologiques sur TGR5.

Le récepteur TGR5

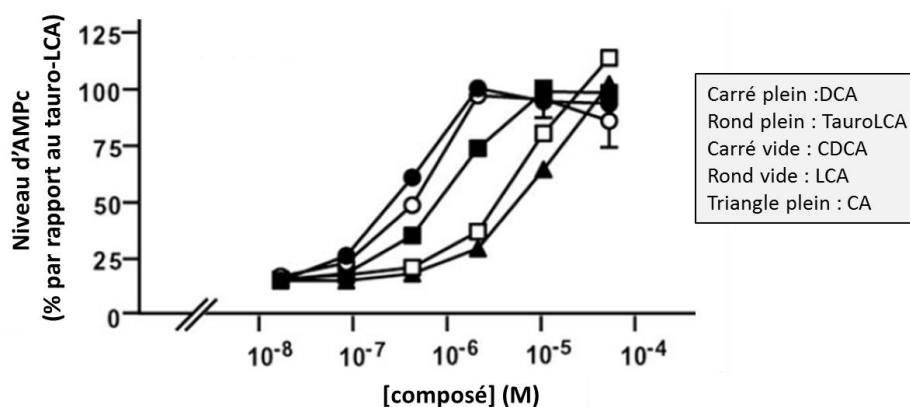


Figure 10 : Courbe dose-réponse de 5 acides biliaires sur le récepteur TGR5.

Les acides biliaires étant également des agonistes du récepteur FXR, d'autres molécules, agonistes non naturels de ce récepteur, ont été testées sur TGR5, comme le TTNPB (*(E)-[tetrahydrotetramethylnaphthalenyl]propyl)benzoic acid*). On constate que celui-ci n'est pas un agoniste de TGR5 (Figure 9). Qui plus est, l'ordre de puissance des acides biliaires n'est pas le même entre FXR et TGR5². Ces deux informations permettent de conclure que ces deux récepteurs, bien qu'étant sensibles à la même famille chimique, ont des pharmacophores différents, et qu'il est donc possible de moduler l'activité de l'un sans impacter sur l'activité de l'autre, via l'utilisation de ligands conçus à cet effet. C'est une donnée indispensable si l'on envisage TGR5 comme une cible pharmacologique potentielle.

2. Expression de TGR5 et localisation tissulaire

L'expression de TGR5 est étendue à un grand nombre d'organes, de tissus, et de populations cellulaires, mais son niveau d'expression peut varier selon sa localisation, et selon l'espèce considérée. Il a été montré par northern blot et RT-PCR que TGR5 été exprimé dans le cœur, les muscles squelettiques, la rate, les reins, le foie, et l'ensemble du tube digestif, à l'exception de l'œsophage et du rectum², mais aussi dans le placenta, à la surface de certaines cellules immunitaire, en particulier les monocytes CD14+ non activés et les macrophages adhérents alvéolaires au niveau pulmonaire³, au niveau des neurones des ganglions spinaux³¹ et dans le tissu adipeux blanc et brun³².

Au niveau intestinal, TGR5 n'est pas présent sur les lignées de cellules épithéliales telles que les Caco2 ou les HT-29, mais il est exprimé par les lignées de cellules entéroendocrines comme les NCI-H716 humaines, ou les SCT-1 et GLUTag murines² et certains neurones des plexus nerveux³³. Au niveau hépatique, l'expression de TGR5 apparaît limitée aux cellules endothéliales sinusoidales³⁴, aux cellules de Kupffer et aux cholangiocytes³⁵. Enfin, au niveau de la vésicule biliaire, TGR5 est exprimé par les cellules musculaires lisses et par les cellules épithéliales³⁶.

La diversité de ces localisations est évidemment associée avec une importante variété d'effets biologiques. Ainsi, l'activation de TGR5 peut entraîner :

- Une augmentation de la dépense énergétique
- Un effet anti-inflammatoire
- Une analgésie et une sensation de démangeaison
- Une diminution de la vidange et une augmentation du remplissage de la vésicule biliaire
- Une hypotension et une tachycardie
- Une augmentation de la sécrétion de GLP-1

Nous reviendrons par la suite sur ces différents effets biologiques liés à l'activation de TGR5, et sur leur impact dans la stratégie de chimie médicinale que nous avons mise en place au sein de ce projet.

3. Voies de signalisation associées à TGR5 et effets biologiques

TGR5 est un récepteur couplé aux protéines G, plus particulièrement à la protéine $G\alpha_s$ ^{2, 37}. D'autres protéines G pourraient cependant aussi être associées aux signaux transmis par TGR5, notamment l' α -gustducine, qui serait partiellement impliquée dans la sécrétion de GLP-1 TGR5-dépendante³⁸. Non activé, TGR5 est présent sur la membrane plasmique des cellules. En présence d'un agoniste, la cascade de signalisation déclenchée va conduire, d'une part à l'internalisation du récepteur² (Figure 11), et d'autre part, à des modifications dynamiques ou phénotypiques de la cellule.

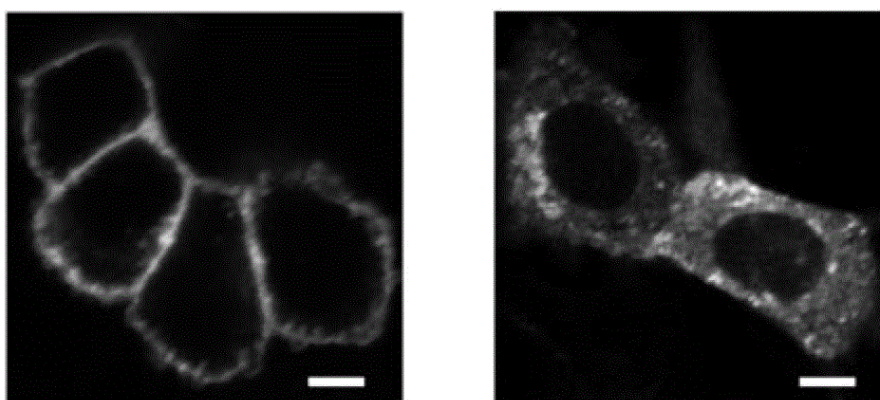


Figure 11 : Localisation d'une protéine de fusion TGR5-Green Fluorescent Protein exprimée par des cellules CHO².
A gauche, en absence d'agoniste. A droite, après 30 min d'incubation avec le TLCA (50 µM)

Selon les types cellulaires concernés, l'activation de TGR5 peut conduire à l'activation de différentes voies de signalisation, comme nous allons maintenant le détailler.

➤ Dans les cellules entéroendocrines L

En utilisant des modèles cellulaires de cellules entéroendocrines L, tels que les cellules STC-1 ou les cellules GLUTag, il a été démontré que les acides biliaires (LCA et DCA, qui sont parmi les plus puissants agonistes naturels de TGR5) ou des analogues semisynthétiques sélectifs de TGR5 tels que l'INT-777 (Figure 14) sont capables de stimuler la sécrétion de GLP-1 (Figure 12)^{5, 28}. Cette stimulation de la sécrétion de GLP-1 par les acides biliaires est

dépendante du récepteur TGR5. En effet, l'utilisation d'un small interfering RNA (siRNA) dirigé contre l'ARNm du TGR5 entraîne une diminution de l'expression de ce récepteur et une diminution de la sécrétion de GLP-1 (Figure 12). A l'inverse, une surexpression de TGR5 via la transfection d'un plasmide codant pour ce récepteur entraîne une augmentation de la sécrétion (Figure 12).

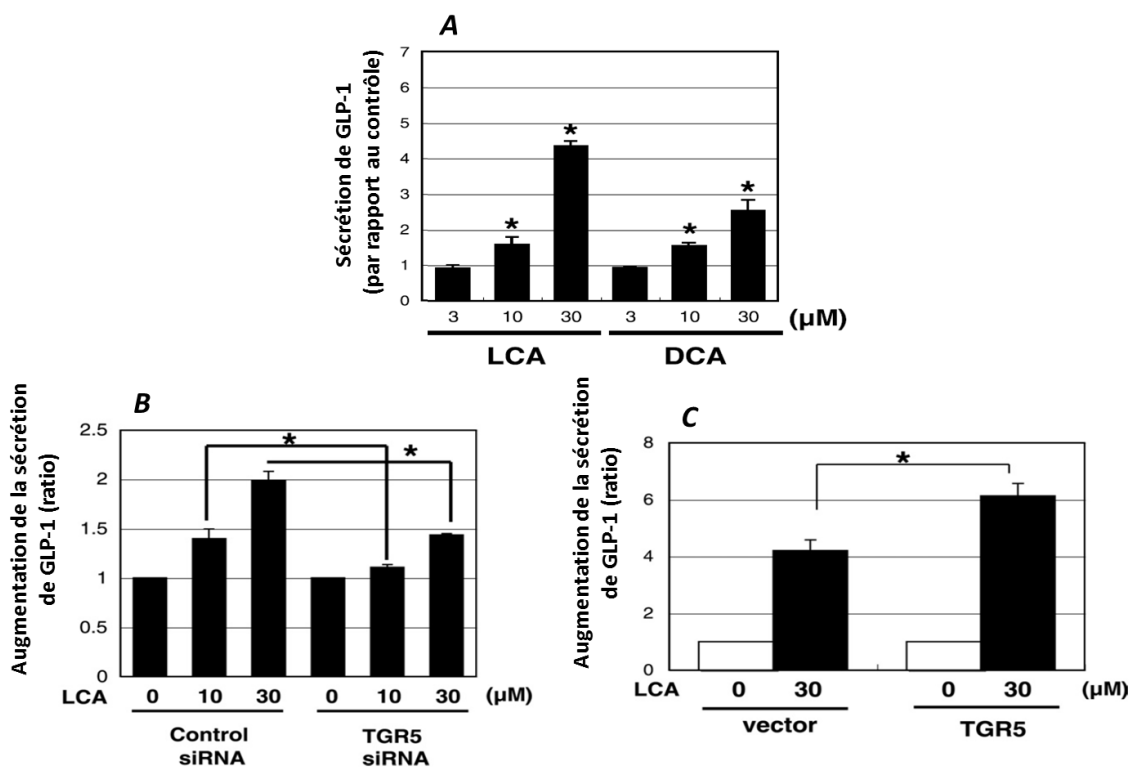


Figure 12 : Stimulation par des acides biliaires de la sécrétion de GLP-1 par des cellules GLUTag de manière TGR5-dépendante²⁸.

A : stimulation de la sécrétion de GLP-1 par le LCA et le DCA.

B : diminution de l'effet du LCA par diminution de l'expression de TGR5.

C : augmentation de l'effet du LCA par augmentation de l'expression de TGR5.

La sécrétion de GLP-1 par les cellules GLUTag après activation de TGR5 est stimulée par l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc, second messenger synthétisé par l'adénylyl cyclase. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de l'adénylyl cyclase (MDL12330A) diminue à la fois la concentration en AMPc intracellulaire et la quantité de GLP-1 sécrétée en réponse à un agoniste de TGR5²⁸ (Figure 13), ce qui montre que la sécrétion de GLP-1 en réponse à un agoniste de TGR5 est AMPc-dépendante.

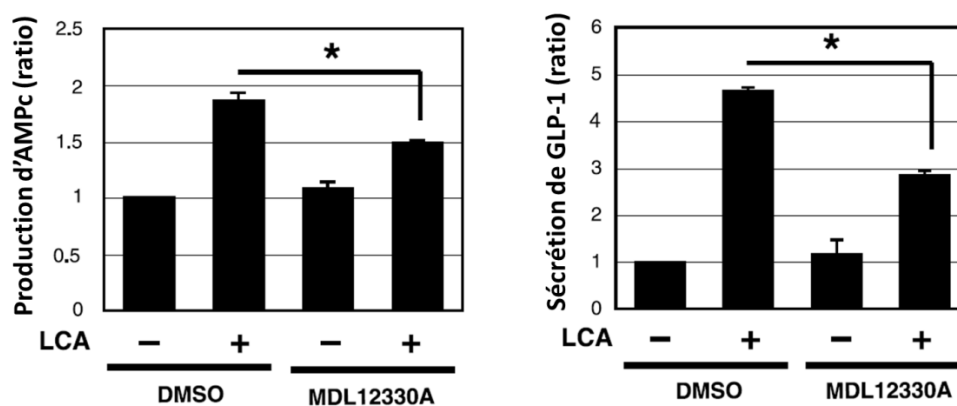


Figure 13 : Impact d'un inhibiteur de l'adénylyl cyclase sur la sécrétion de GLP-1 stimulée par le LCA²⁸.

DMSO : contrôle. MDL12330A : inhibiteur de l'adénylyl cyclase.

De plus, dans des cellules STC-1, la sécrétion de GLP-1 par l'agoniste de TGR5 INT-777 (Figure 14) est corrélée à l'augmentation du ratio ATP/ADP, suite à l'augmentation de la phosphorylation oxydative AMPc-dépendante, illustrée par l'augmentation de la consommation en oxygène, l'augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase, et l'abolition de ces effets en présence du MDL12330A⁵(Figure 14). Or, l'augmentation du ratio ATP/ADP est classiquement détectée, entre autre, par des canaux potassiques ATP-dépendant (canaux K_{ATP}), dont certaines sous-unités ont été mises en évidence dans les cellules GLUTag³⁹. De manière identique à ce qui se produit dans les cellules β pancréatiques lors de la sécrétion d'insuline, l'augmentation du ratio ATP/ADP peut entraîner la fermeture de ces canaux K_{ATP} , qui entraîne une diminution du courant d'hyperpolarisation, une dépolarisation de la membrane plasmique, qui active un canal calcique voltage-dépendant (canal Ca_v). S'en suit une entrée massive de Ca^{2+} , qui déclenche la sécrétion d'insuline, ou dans le cas des cellules GLUTag, de GLP-1.

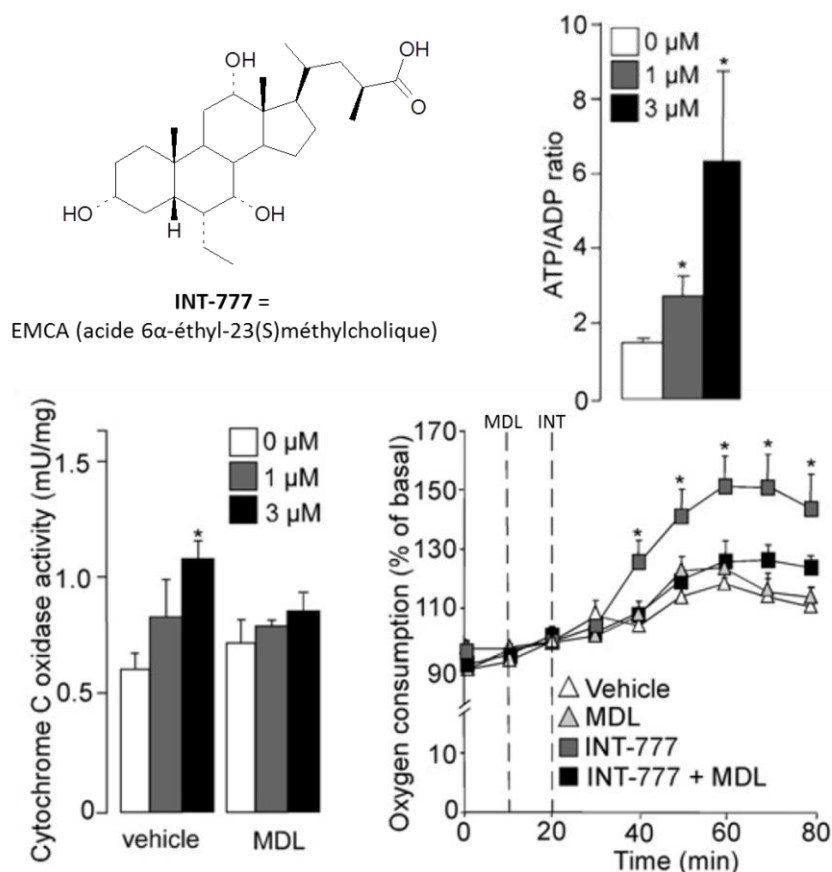


Figure 14 : INT-777 entraine une augmentation AMP-dépendante de la phosphorylation oxydative⁵
En haut à gauche : structure de l'INT-777.
En haut à droite : mesure du ratio ATP/ADP en fonction de la concentration en INT-777.
En bas à gauche : mesure de l'activité de la cytochrome c oxydase, en présence ou en absence de l'inhibiteur de l'adényl cyclase MDL12330A.
En bas à droite : mesure de la consommation en oxygène (les barres pointillées indiquent le moment d'ajout du composé dans le milieu)

En plus de la voie de sécrétion apparentée à celle de l'insuline, les cellules entéroendocrines L possèdent d'autres voies de signalisation menant à la sécrétion de GLP-1. Afin d'étudier la voie AMPc-dépendante, il est possible d'utiliser sur des modèles cellulaires la combinaison IBMX/forskoline. La forskoline est un activateur de l'adénylyl cyclase, tandis que l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) est un inhibiteur de phosphodiesterase. Leur association permet de générer une augmentation importante de la concentration intracellulaire en AMPc. En utilisant cette association sur des cellules GLUtag, il a été montré que le H89, un inhibiteur de la Protéine Kinase A (PKA), diminuait mais n'abolissait pas la sécrétion de GLP-1⁴⁰. L'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc, en plus d'activer la PKA, module également certains canaux ioniques, comme les canaux activés par hyperpolarisation, responsable du courant I_h , ainsi que des canaux potassiques hyperpolarisants⁴⁰.

Une voie PKA-indépendante a également été mise en évidence. L'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc peut en effet activer la voie Epac/PLC- ϵ dans les cellules STC-1, ce qui conduit à la libération d'Inositol-3-Phosphate, ainsi qu'à une

augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , toutes deux impliquées dans la sécrétion de GLP-1³⁷.

En résumé, l'activation du récepteur TGR5 exprimé par les cellules entéroendocrines L entraîne une sécrétion de GLP-1 via une voie de signalisation AMPc-dépendante, PKA-dépendante et PKA-indépendante.

Nous avons vu précédemment l'intérêt de la voie incrétine dans le traitement du diabète, nous discuterons ultérieurement des avantages et des inconvénients à stimuler la sécrétion de ce peptide.

➤ *Dans les cellules des muscles squelettiques et du tissu adipeux brun*

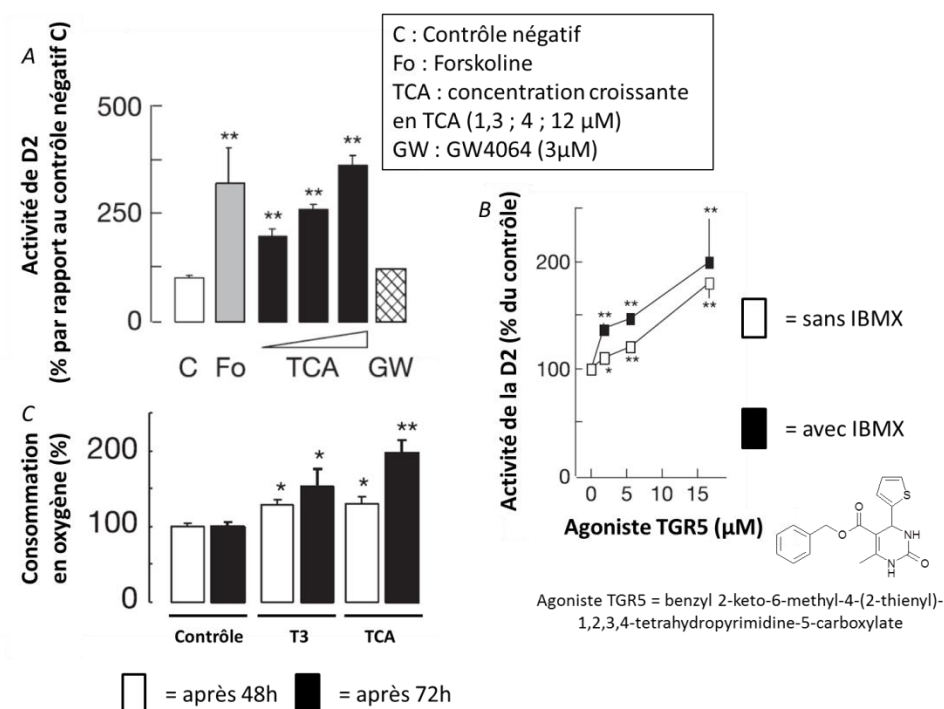
Le tissu adipeux brun (BAT) est un tissu impliqué dans la dépense énergétique, dont le rôle majeur est d'assurer la thermogénèse. Ce tissu est présent chez les rongeurs, et on le pensait présent chez l'humain uniquement chez le nouveau-né. Cependant, certaines publications montrent que le tissu adipeux brun est aussi présent chez l'homme adulte, et qu'il a une importance métabolique non négligeable⁴¹.

Chez la souris, les cellules du tissu adipeux brun expriment le récepteur TGR5 en grande quantité, ainsi qu'une enzyme très importante dans le métabolisme général, la lodothyronine déiodinase de type 2 (D2). L'expression de cette enzyme est entre autre régulée par la présence sur la séquence promoteur d'un élément de réponse à l'AMPc, le CRE⁴. Puisque l'activation de TGR5 entraîne une augmentation de la concentration en AMPc, l'effet d'acides biliaires a été évalué sur ces cellules. L'ajout d'acides biliaires tels que le TCA a montré, d'une part, une augmentation dose dépendante de la concentration intracellulaire en AMPc, mais également une augmentation de l'expression et de l'activité de la D2⁴. Un agoniste spécifique du récepteur FXR, le GW4064 était sans effet, montrant que l'effet observé était indépendant du FXR, et donc sans doute lié au récepteur TGR5.

La présence de tissu adipeux brun d'importance métabolique significative chez l'homme est une notion récente. Chez l'homme, les muscles squelettiques jouent un rôle important dans le métabolisme et la thermogénèse⁴². Or, les muscles squelettiques, et en particulier les myoblastes des muscles squelettiques humains (HSMM) expriment à la fois TGR5 et D2.

Une expérience similaire à la précédente a montré que le TCA est capable d'induire une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc et une augmentation de l'activité de la D2 chez des HSMM (Figure 15A). Cet effet n'était pas obtenu avec un agoniste sélectif du FXR, le GW4064. D'autre part, un agoniste non stéroïdien sélectif de TGR5, s'est avéré capable d'induire une augmentation de l'activité de la D2 dans des HSMM (Figure 15B).

Le récepteur TGR5



Or la D2 est une enzyme qui catalyse la transformation de la pré-hormone L-thyroxine (T4) en hormone 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3). Cette hormone agit sur presque toutes les cellules de l'organisme. De manière générale, elle stimule le métabolisme de base, augmentant entre autres la synthèse protéique, la lipolyse, le rythme cardiaque, et la consommation en oxygène. Dans ce contexte, il a été montré que le TCA (à 5µM) était capable d'entraîner une augmentation de la consommation en oxygène des HSMM supérieure à celle observée avec la T3 (à 50nM)⁴ (Figure 15C). La consommation en oxygène est le reflet de la phosphorylation oxydative des mitochondries : plus elle est élevée, plus la dépense énergétique de la cellule est élevée.

Ainsi, dans des cellules issues de tissus impliqués dans la thermogénèse, l'activation de TGR5 est capable d'entraîner l'augmentation de la consommation en énergie via l'augmentation de l'expression et de l'activité d'une enzyme clé dans le métabolisme de base : la lodothyronine déiodinase de type 2. Cet effet est particulièrement intéressant dans la perspective de prendre en charge des pathologies issues de déséquilibre métaboliques, telles que le diabète de type 2 ou l'obésité.

➤ Dans les cellules musculaires lisses

Plusieurs études ont exploré l'effet de l'activation de TGR5 sur la contractilité des muscles lisses associés à différents tissus, comme l'estomac⁴³, les artères⁴⁴, ou la vésicule biliaire³⁶. Bien que les voies de signalisation pharmacologiques mises en évidence dans ces différents

tissus ne soient pas identiques, elles impliquent toutes le récepteur TGR5, et conduisent toutes à une relaxation des muscles lisses, ce qui peut conduire *in vivo* à un ralentissement du transit du bol alimentaire, à une hypotension suivie d'une accélération réflexe du rythme cardiaque, ou à une diminution de la vidange de la vésicule biliaire, respectivement.

➤ *Dans certaines populations cellulaires hépatiques*

TGR5 n'est pas exprimé dans les hépatocytes, mais d'autres populations cellulaires hépatiques expriment ce récepteur.

Dans les cellules endothéliales sinusoidales, l'activation de TGR5 génère une augmentation de la concentration en AMPc, qui active la PKA. Cette enzyme phosphoryle l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), ce qui entraîne une augmentation de la production d'oxyde nitrique (NO), un puissant vasodilatateur, important dans le maintien de la microcirculation hépatique. De plus, on observe également une phosphorylation du CD95. Ce facteur pro-apoptotique est ainsi inactivé. L'activation de TGR5 a donc un effet hépatoprotecteur en agissant sur les cellules endothéliales sinusoidales, d'une part parce qu'elle favorise la perfusion sanguine, et d'autre part parce qu'elle prévient l'apoptose de ces cellules⁴⁵.

Les cellules des conduits biliaires, les cholangiocytes, ainsi que les cellules épithéliales de la vésicule biliaire expriment TGR5. Son activation favorise la sécrétion de fluide par ces cellules via la stimulation du canal à chlorure CFTR, dont l'activité est en partie régulée par la concentration en AMPc⁴⁵. Cet effet, associé à la relaxation des muscles lisses de la vésicule biliaire vu précédemment, concourt à une augmentation du volume de la vésicule biliaire par augmentation du remplissage de la vésicule biliaire et diminution de sa vidange.

➤ *Dans certaines cellules immunitaires*

Au niveau hépatique, TGR5 est également présent à la surface des cellules de Kupffer. Ces cellules sont des macrophages résidents des vaisseaux hépatiques. La stimulation de TGR5 dans ces cellules se traduit par une baisse de la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse au lipopolysaccharide. Ainsi, le potentiel hépatoprotecteur de TGR5 est complété par la diminution de l'inflammation dans des cas de stéatose hépatique, où la composante inflammatoire tient un rôle non négligeable⁴⁵.

Les cellules de Kupffer ne sont pas les seuls macrophages à exprimer TGR5. C'est une propriété commune à de nombreuses lignées de macrophages^{3, 46}. L'activation de ce récepteur par un agoniste spécifique entraîne la diminution de la production de TNF α , d'IL-6, et d'autres cytokines pro-inflammatoires. Cet effet est dû à l'inhibition AMPc-dépendante de la translocation nucléaire du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B⁴⁶. Ainsi, l'activation de TGR5 a un effet anti-inflammatoire sur les populations de monocytes et de macrophages.

C. Intérêts et limites du récepteur TGR5 en thérapeutique

Comme nous venons de le voir, TGR5 est impliqué dans plusieurs voies de signalisation, et son activation peut entraîner des réponses cellulaires très variées selon le type cellulaire concerné (Figure 16).

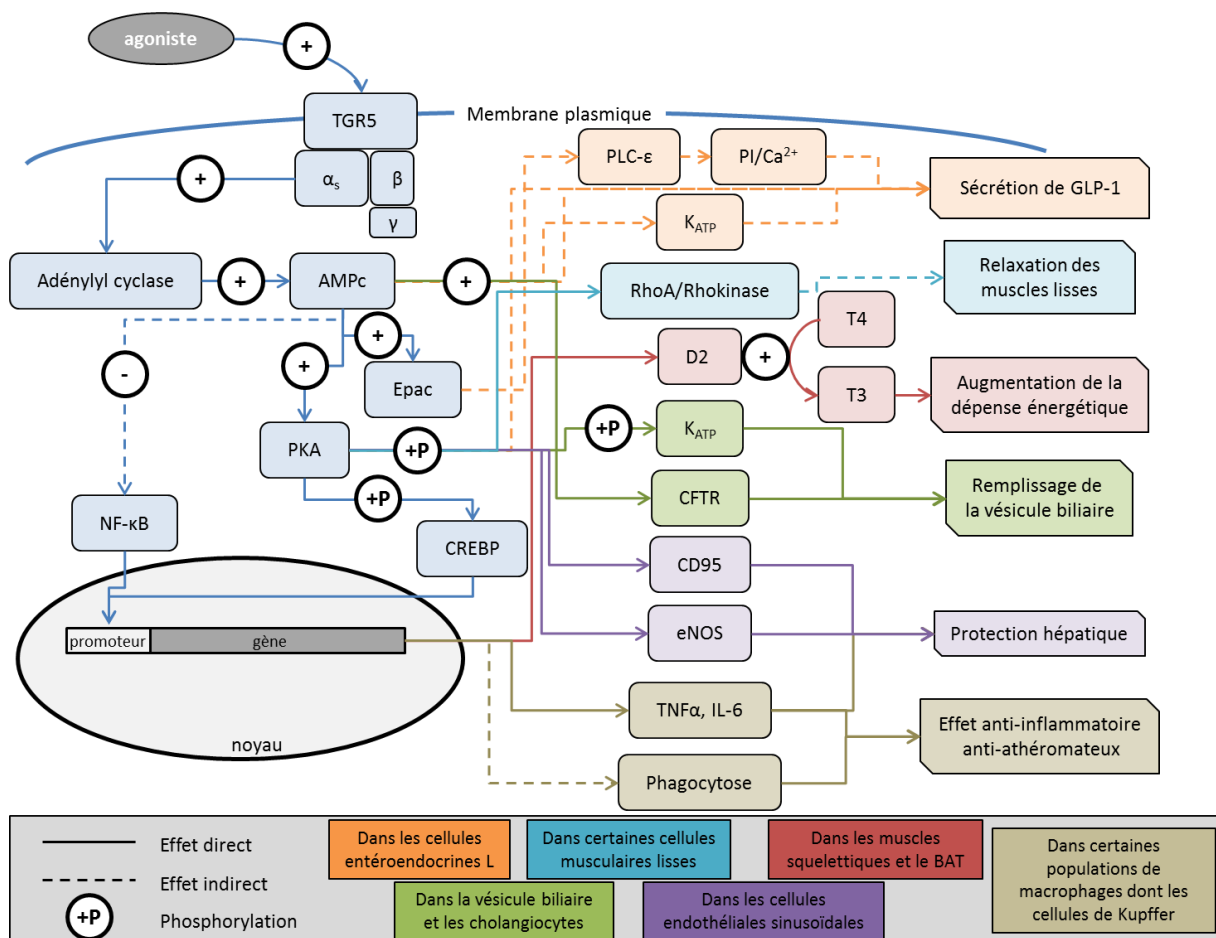


Figure 16 : Schéma général des différentes voies de signalisation décrites suite à l'activation du récepteur TGR5.

Physiologiquement, TGR5 peut être considéré comme un des éléments qui permettent à l'organisme de différencier les périodes post prandiales des périodes de jeûne, et d'adapter le métabolisme énergétique à l'état de l'organisme, favorisant le stockage et la dépense dans un cas, ou l'économie dans l'autre. En effet, puisque les acides biliaires libérés dans le duodénum sont à 95 % réabsorbés plus bas dans l'intestin, et que l'extraction des acides biliaires de la circulation portale par le foie n'est pas efficace à 100 %, lors d'un repas, la sécrétion d'acides biliaires se traduit par une augmentation de leur concentration, dans la lumière intestinale bien sûr, mais aussi dans la circulation systémique⁴⁷. On constate que l'activation de TGR5 par un agoniste (physiologique ou non) chez les animaux en déséquilibre énergétique (régime HF, ou déficience en léptine-récepteur) entraîne une augmentation de la dépense énergétique par augmentation du métabolisme de base, une meilleure tolérance au glucose, limite la prise de poids et les modifications néfastes que

peuvent subir les organes dans un tel environnement, comme par exemple l'apparition d'une stéatose hépatique⁴. Ces effets bénéfiques sont corrélés à l'augmentation de l'activité de voies de signalisation liées au TGR5 qui sont :

- L'augmentation de l'activité et de l'expression de la iodothyronine déiodinase de type 2 dans le tissu adipeux brun.
- La stimulation de la sécrétion de GLP-1 par les cellules entéroendocrines L intestinales.

Ainsi, l'utilisation d'agonistes sélectifs de TGR5 dans la prise en charge de différentes pathologies telles que le diabète, l'obésité, semble très prometteuse, même si aucune expérimentation sur l'homme n'a encore été réalisée.

Dans la prise en charge du diabète, l'intérêt d'utiliser un agoniste TGR5 est multiple. D'une part, le GLP-1 est connu pour jouer un rôle bénéfique dans cette pathologie, et les traitements incrétinomimétiques (agonistes GLP-1) et incrétinopotentiators (inhibiteurs de DPP4) ont fait leurs preuves, en particulier en termes d'efficacité^{48, 49}. D'autre part, ces traitements connaissent des limites en termes de sécurité (risque suspecté de pancréatite pour les agonistes GLP-1, risque d'infection des voies respiratoires pour les inhibiteurs de DPP4) et en termes d'observance (voie injectable uniquement dans le cas des agonistes GLP-1). En stimulant la sécrétion du peptide naturel, on s'affranchit des problèmes liés aux peptides artificiels agonistes GLP-1, et des effets de l'inhibition d'une enzyme impliquée dans plusieurs voies métaboliques différentes. De plus, l'effet paracrine du GLP-1 peut avoir une importance physiologique non négligeable, en particulier du fait de sa demi-vie courte, et il est peu reproduit par les thérapies incrétines actuelles. Stimuler la sécrétion permettrait d'intensifier les effets physiologiques du GLP-1, sans trop interférer avec d'autres systèmes. Qui plus est, la sécrétion de GLP-1 par les cellules entéroendocrine L sous la stimulation d'un agoniste TGR5 peut être accompagnée par la sécrétion d'autres hormones aux effets intéressants dans un contexte de désordre métabolique, telle que l'oxyntomoduline et le peptide YY (PYY) par exemple⁵⁰. En effet, PYY est connu pour ses effets anorexigène, et inhibiteurs sur la motilité intestinale et sur la vidange gastrique. L'oxyntomoduline est elle aussi capable d'induire une inhibition de la vidange gastrique.

TGR5 n'est pas uniquement exprimé dans les cellules entéroendocrines L intestinales. Un agoniste TGR5, une fois dans la circulation systémique, peut permettre l'augmentation de la dépense énergétique en stimulant l'expression et l'activité de la D2 au niveau des muscles et/ou du tissu adipeux brun, effet qui peut s'avérer bénéfique dans la prise en charge du surpoids et de l'obésité. L'activation de la D2 va augmenter la concentration en T3, hormone favorisant de nombreux processus tels que la synthèse protéique ou l'activité mitochondriale.

La réduction de la prise de poids, voire même la perte de poids, s'accompagne d'effets bénéfiques observés sur les organes, et en particulier sur le foie. Parmi eux, il est intéressant

de noter la diminution du taux de triglycérides plasmatiques, qui est un facteur de risque cardiovasculaire impliqué dans le syndrome métabolique.

Il est à noter que l'effet sur la T3 est local, spécifique au tissu, et ne se répercute pas sur les taux plasmatiques de cette hormone⁴. C'est un point assez critique, car une trop forte production de cette hormone à l'échelle de l'organisme entraîne de nombreux dérèglements : troubles cardiaques, perte ou prise de poids, fatigue intense, ... De plus, TGR5 n'agit pas sur des centres de régulation situés au niveau du système nerveux central, comme le centre de régulation de l'appétit. Au vu de la complexité des effets obtenus lorsque l'on modifie l'activité du système nerveux, il est moins risqué de prendre en charge l'obésité sous un angle métabolique que sous un angle neurologique.

Comme expliqué dans la première partie, le diabète de type 2, l'obésité, le syndrome métabolique, sont différentes pathologies issues d'un déséquilibre énergétique du patient. Cette origine commune, et le fait que ces pathologies se développent souvent concomitamment chez le même patient, a entraîné l'apparition du terme « diabésité ». Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement qui prenne en charge ces désordres métaboliques comme un tout. Dans ce contexte, TGR5 semble être une cible attrayante pour lutter contre ce problème de santé publique.

D. Agonistes non stéroïdiens décrits du récepteur TGR5 et leurs effets biologiques

L'ensemble des caractéristiques du récepteur TGR5 décrites précédemment semblent très prometteuses dans le contexte de la prise en charge de maladies métaboliques, et de nombreuses structures de recherche ont ainsi développé des programmes visant à étudier et à développer des agonistes de TGR5. Cette cible est d'ailleurs devenue l'une des 5 cibles thérapeutiques nouvelles (*i.e.* dont aucune application n'a encore reçue d'AMM dans le monde) sur 304 pour laquelle plus de 5 structures de recherche ont lancé un programme d'études précliniques⁵¹.

C'est dans ce contexte que plusieurs séries chimiques ont été développées pour obtenir des agonistes de TGR5 qui soient sélectifs, puissants et biodisponibles par voie orale. Je vais à présent détailler quelques-unes de ces séries chimiques, en me focalisant sur les séries chimiques non apparentées aux acides biliaires, et pour lesquelles des effets *in vivo* ont été décrits, afin de mettre en évidence les intérêts et les limites inhérents au développement d'agonistes systémiques du récepteur TGR5.

Je n'évoquerai pas ici de séries chimiques décrites uniquement dans des brevets⁵² ou dérivées de produits naturels⁵³⁻⁵⁶.

1. 3-Aryl-4-isoxazolecarboxamides

Une série de 3-Aryl-4-isoxazolecarboxamides a été développée par l'entreprise pharmaceutique GSK. L'optimisation du hit issu d'un criblage à haut débit a permis d'obtenir des agonistes puissants et sélectifs de TGR5, dont les deux composés GSK1 et GSK2⁵⁷ (Figure 17). Etant donné la bonne activité de ces composés, illustrée par leur EC₅₀ de l'ordre de 30 nM, et malgré la faible biodisponibilité par voie orale (1% ou moins), que ce soit chez le rat ou chez le chien, du fait d'une instabilité métabolique, une évaluation de leur activité GLP-1 sécrétagogue *in vivo* (chien) a été réalisée. Pour pallier le problème de biodisponibilité, une administration intra-jéjunale via la voie rectale a été choisie. La concentration plasmatique de GLP-1 suite à la co-administration de glucose et des composés lors de cette expérience a effectivement été augmentée⁵⁷ (Figure 17), mettant en évidence la capacité GLP-1 sécrétagogue d'agonistes sélectifs de TGR5.

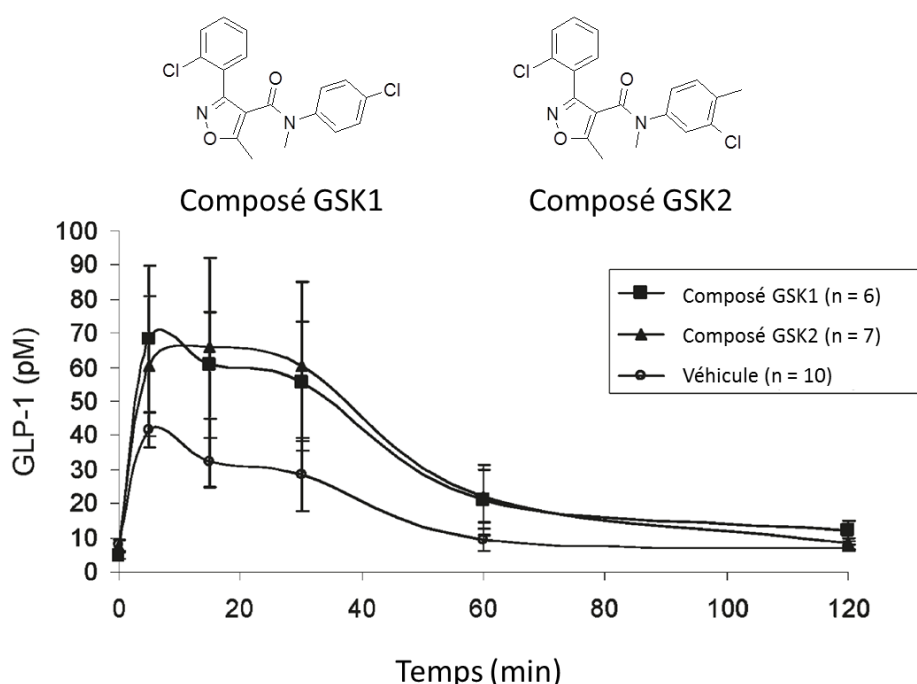


Figure 17 : Structure et caractérisation des composés GSK1 et GSK2. Sécrétion de GLP-1 après une dose intra-jéjunale (1mg/kg) coadministrée avec un challenge au glucose à $t = 0\text{min}$ (0.125 g/kg)⁵⁷

2. 1-hydroxyimino-3,3-diphenylpropanes

Cet effet GLP-1 sécrétagogue a aussi été mis en évidence dans une série chimique développée par Roche. L'optimisation de 1-hydroxyimino-3,3-diphenylpropanes a permis l'obtention de composés puissants et sélectifs sur le récepteur TGR5. L'évaluation de l'activité des composés, sur le récepteur humain et sur le récepteur murin, a montré une différence d'un facteur 10 environ, avec des EC₅₀ de l'ordre de 10nM sur l'humain, et de 100 nM sur le murin pour les composés les plus puissants⁵⁸, dont RO1 et RO2 (Figure 18). Il est intéressant de noter que le passage d'une lignée cellulaire transgénique pour TGR5 à une lignée cellulaire l'exprimant à un niveau constitutif (les NCI-H716, cellules entéroendocrines humaines en l'occurrence), entraîne une diminution d'un facteur 20 de l'EC₅₀ (de l'ordre de

200 nM). De plus, les paramètres de pharmacocinétique *in vitro* et *in vivo* ont également été optimisés, permettant l'obtention de composés biodisponibles par voie orale. Ainsi, il a pu être montré que de tels agonistes de TGR5 étaient capables de stimuler la sécrétion de GLP-1, et du peptide PYY après administration per os, et que cette stimulation s'accompagnait d'un effet bénéfique sur la glycémie lors d'un test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT) avec une hyperglycémie moins prononcée dans les groupes traités que dans le groupe véhicule (Figure 18)⁵⁸. Ces données confirment à nouveau l'intérêt de cibler TGR5 pour la prise en charge du diabète.

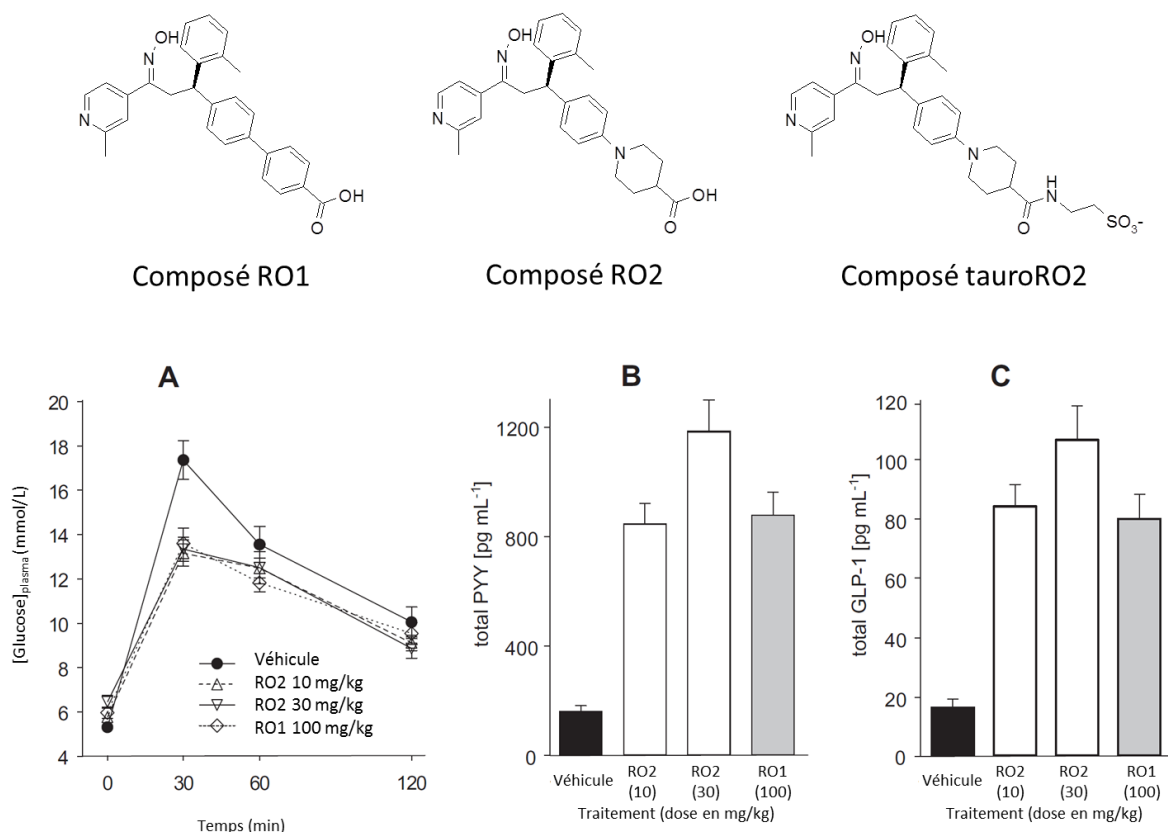


Figure 18 : Structure et caractérisation des agonistes de TGR5 RO1 RO2 et tauroRO2⁵⁸.

- Evaluation de l'effet d'une administration unique des composés RO1 et RO2 sur l'hyperglycémie postprandiale lors d'une épreuve d'OGTT chez des souris hTGR5 Knock-In.
- Evaluation de la sécrétion de PYY après administration unique des composés RO1 et RO2 chez des souris hTGR5 Knock-In.
- Evaluation de la sécrétion de GLP-1 après administration unique des composés RO1 et RO2 chez des souris hTGR5 Knock-In.

Une caractérisation plus poussée du composé RO2 et d'un dérivé tauro-conjugué (tauroRO2, Figure 18) a été publiée, et confirme ces résultats. La complémentarité d'effets attendue entre un inhibiteur de DDP4 et un agoniste de TGR5 GLP-1 sécrétagogue a également été mise en évidence par une expérience d'OGTT⁵⁹. Il semblerait également que l'exposition systémique _et non uniquement intestinale_ à un agoniste TGR5 soit nécessaire pour obtenir un effet GLP-1 sécrétagogue, cependant les données présentées pour étayer cette

hypothèse ne me paraissent pas valides. En particulier, aucune caractérisation, ni du modèle transgénique murin utilisé (Knock-In pour le TGR5 humain) ni du composé tauroRo2 considéré comme faiblement biodisponible par voie orale, n'est décrite. Nous verrons d'ailleurs par la suite que cette hypothèse s'est avérée erronée.

3. Trifluorométhyl(pyrimidin-2-yl)azetidine-2-carboxamides

Une série d'agoniste de TGR5 basés sur un motif Trifluorométhyl(pyrimidin-2-yl)azetidine-2-carboxamides a également été publiée par Novartis. Dans cette série, le composé NOV1 (Figure 19) présente une très bonne activité sur les récepteurs murin et humain (avec une EC_{50} de 1nM et 15 nM respectivement), et stimule la sécrétion de GLP-1 sur les cellules GLUTag ($EC_{50} = 46$ nM)⁶⁰. Une fois encore, on peut remarquer d'une part la variation d'activité entre les homologues de deux espèces différentes, et d'autre part entre les cellules qui sur-expriment le récepteur et celles qui l'expriment de manière constitutive. Ce composé est issu d'une optimisation à la fois des paramètres pharmacologiques mais aussi des paramètres pharmacocinétiques, et présente une biodisponibilité par voie orale de 96.5%. Une évaluation *in vivo* de son activité GLP-1 sécrétagogue a ainsi pu être réalisée chez la souris, et montre une augmentation d'un facteur 4 de la quantité de GLP-1 total sécrété lors de l'administration per os de ce composé⁶⁰ (Figure 19). Pour apprécier l'efficacité à plus long terme, une évaluation sur 5 semaines chez des souris ob/ob (modèle génétique de diabésité) a été réalisée, en comparaison avec un inhibiteur de DPP4. Malgré un effet intéressant sur la réduction de l'hyperglycémie post-prandiale lors d'un OGTT au jour 1, aucun effet n'a pu être observé au jour 26, et ce bien que l'exposition systémique n'ait pas varié (Figure 19). Ces données laissent suspecter des modifications de l'expression ou de la localisation du récepteur, qui auraient conduit à une tachyphylaxie, suite à cette exposition chronique. La tachyphylaxie étant ligand-dépendant^{61, 62}, ces résultats ne compromettent pas le statut de cible thérapeutique potentielle de TGR5, mais il sera néanmoins important de s'assurer assez tôt dans le développement de nouvelles séries de l'absence d'apparition de ce phénomène.

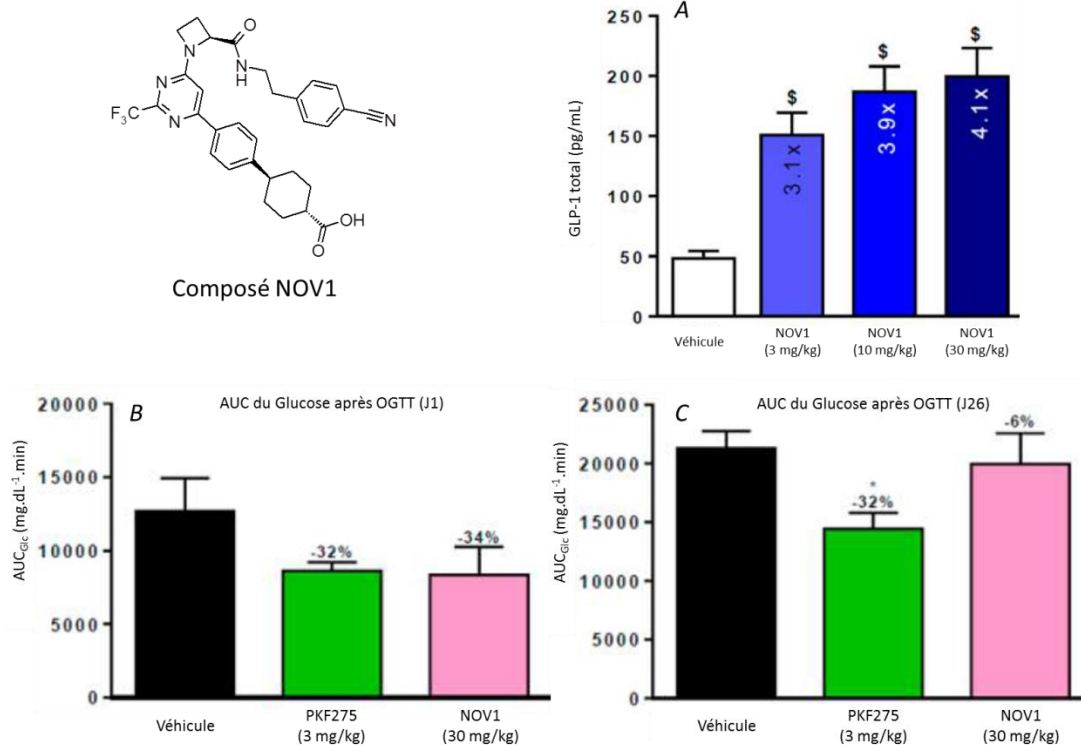


Figure 19 : Structure et caractérisation de l'agoniste de TGR5 NOV1⁶⁰.

- A. Evaluation de la sécrétion de GLP-1 après administration unique du NOV1 chez des souris C57/Bl6
 - B. Evaluation au jour 1 de l'effet de l'administration quotidienne du composé sur l'hyperglycémie postprandiale lors d'une épreuve d'OGTT chez des souris ob/ob.
 - C. Evaluation au jour 26 de l'effet de l'administration quotidienne du composé sur l'hyperglycémie postprandiale lors d'une épreuve d'OGTT chez des souris ob/ob.
- PKF275 est un inhibiteur de DPP4.

4. [1,2,3]triazoles et tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidine amides

Pfizer a récemment publié deux séries chimiques distinctes d'agonistes de TGR5 : des dérivés de [1,2,3]triazoles⁶³ et des dérivés de tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidine amides⁶⁴. L'optimisation de ces séries a permis l'obtention des composés PF1 et PF2 (Figure 20), puissants agonistes du récepteur humain ($EC_{50} = 5,5$ nM et $EC_{50} = 2.3$ nM respectivement), et équipotent sur le récepteur canin. Comme observé précédemment, une différence d'activité notable a été observée entre les cellules sur-exprimant TGR5 et celles l'exprimant normalement. Une évaluation *ex vivo* de l'activité anti-inflammatoire de ces composés a été réalisée en mesurant l'inhibition de la production de TNF α (Tumor Necrosis Factor α) en réponse au LPS (Lipopolysaccharide) sur des échantillons de sang total humain (Figure 20). De manière intéressante, l' EC_{50} mesurée sur ce test pour PF2 est dans le même ordre de grandeur que son EC_{50} sur cellules ne sur-exprimant pas TGR5, ce qui renforce la relevance de ce test vis-à-vis de l'activité réelle *in vivo* des composés.

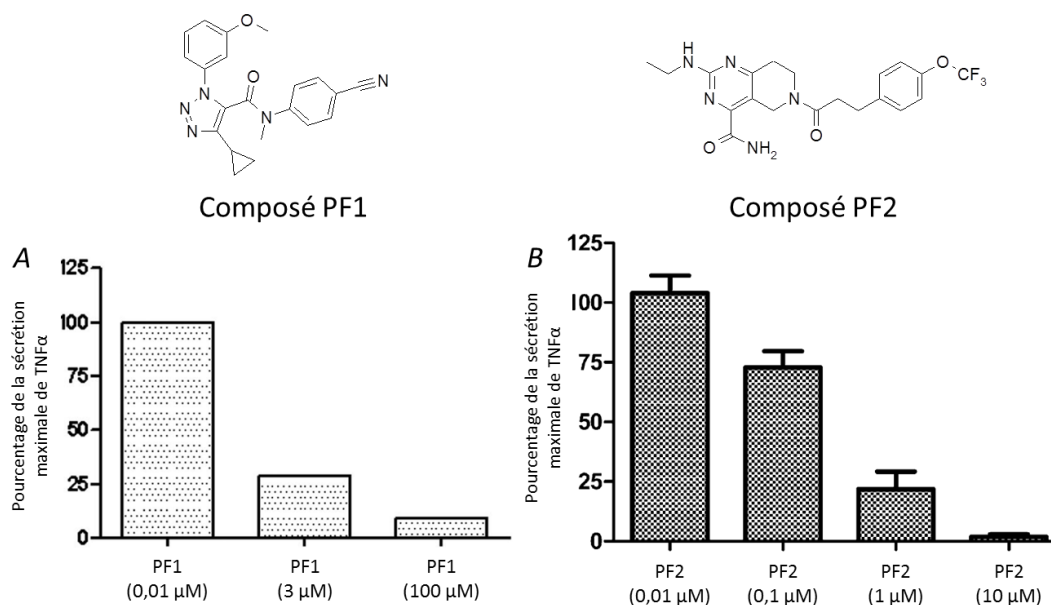


Figure 20 : Structure et caractérisation des agonistes de TGR5 PF1 et PF2^{63, 64}.

- A. Inhibition de la sécrétion de TNFα par PF1 lors d'un challenge au LPS ex vivo sur sang total humain (valeurs sur 1 donneur)
- B. Inhibition de la sécrétion de TNFα par PF2 lors d'un challenge au LPS ex vivo sur sang total humain (valeur moyenne sur 3 donneurs)

Pour ces deux composés, la sélectivité sur plus de 50 autres cibles a été validée. Les caractéristiques pharmacocinétiques de ces deux composés, bien que non optimales, ont été jugées suffisantes pour réaliser une évaluation pharmacologique chez le chien. Aucune évaluation du bénéfice potentiel de ces composés sur des paramètres métaboliques n'a cependant été publiée. Néanmoins, une évaluation des paramètres cardiovasculaires a été réalisée, et a pu montrer que ces agonistes sélectifs de TGR5, de structure chimique non apparentée, provoquaient tous les deux une hypotension via une vasodilatation périphérique, entraînant également une tachycardie réflexe⁴⁴. De plus, cet effet était obtenu à des doses équivalentes à celles nécessaires à l'obtention d'autres effets pharmacologiques (i.e. un effet anti-inflammatoire), ce qui compromet fortement l'utilisation d'agonistes systémiques de TGR5. Il est toutefois important de noter que cet effet a été observé uniquement chez le chien, et pas chez le rat.

5. 4-Phenoxynicotinamides

Le développement d'une série de 4-Phenoxynicotinamides par le Shanghai Institute of Materia Medica (SIMM) a mené à l'obtention d'agonistes de TGR5 puissants, dont le composé SI1 (Figure 21), présentant une différence d'activité entre le récepteur murin et le récepteur humain⁶⁵ (0.72 nM sur humain, 6.2 nM sur murin). De manière originale, une partie du développement de cette série a constitué à introduire des modifications dans le but d'augmenter la sensibilité au métabolisme hépatique des composés, afin de diminuer l'exposition systémique et donc les risques d'effets non métaboliques comme les modifications de la physiologie de la vésicule biliaire.

Le composé SI1 s'est avéré être GLP-1 sécrétagogue *in vivo*, et a également montré un effet bénéfique sur la gestion de l'hyperglycémie postprandiale suite à une OGTT sur des souris ICR⁶⁵ (Figure 21). Cependant, son exposition systémique non négligeable chez la souris (C_{max} = 3 μ M, soit 500 fois l' EC_{50} sur cellules sur-exprimant TGR5) a entraîné une augmentation de la taille de la vésicule biliaire (Figure 21C).

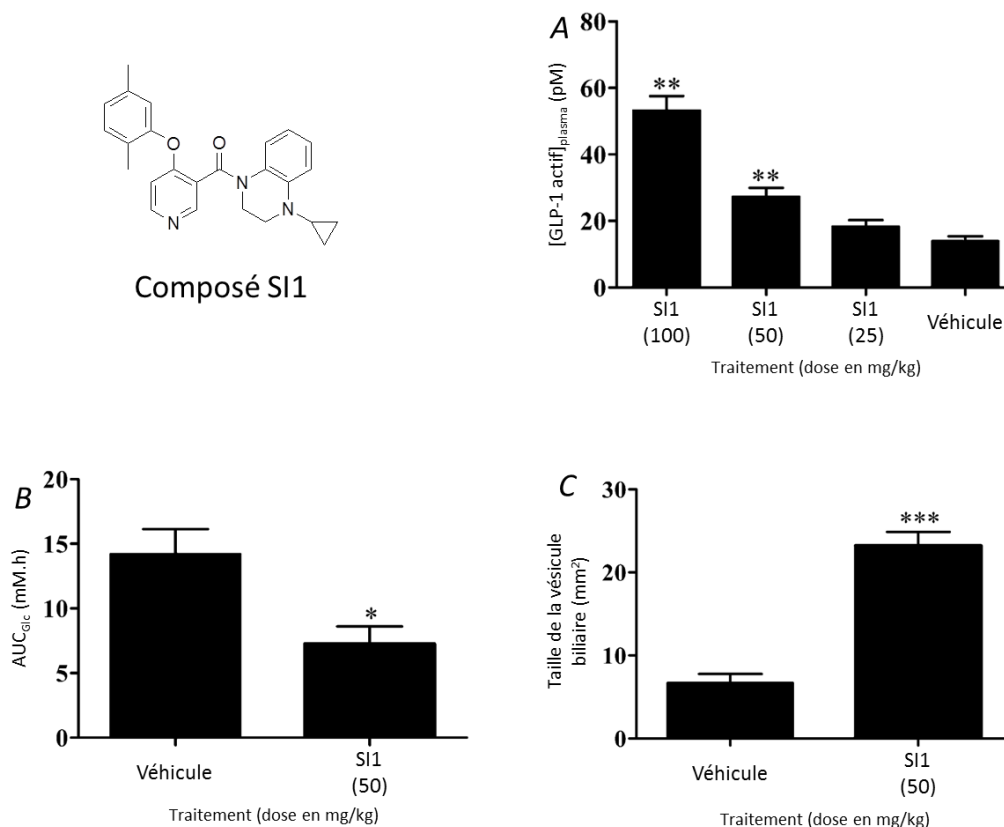


Figure 21 : Structure et caractérisation de l'agoniste de TGR5 SI1⁶⁵.

- A. Evaluation de la sécrétion de GLP-1 après administration unique du SI1 chez des souris ICR.
- B. Evaluation de l'effet d'une administration unique du composé SI1 sur l'hyperglycémie postprandiale lors d'une épreuve d'OGTT chez des souris ICR.
- C. Evaluation de l'effet d'une administration unique du composé SI1 sur la taille de la vésicule biliaire (Longueur x largeur) chez des souris ICR.

6. Conclusions

Comme nous venons de le détailler, l'activation de TGR5 par des agonistes sélectifs de ce récepteur non dérivés d'acides biliaires permet l'obtention d'effets biologiques divers chez l'animal. En particulier, ces différentes expériences confirment la capacité d'agonistes de TGR5 à induire une sécrétion de GLP-1, mais aussi de PYY. Ces deux hormones peptidiques ont un fort potentiel dans l'amélioration des paramètres métaboliques anormaux présents dans un contexte de diabète et/ou d'obésité, et ceci est d'ailleurs confirmé par l'amélioration de la gestion de l'hyperglycémie lors d'une épreuve d'OGTT.

Cependant, d'autres effets ont aussi été observés, notamment une augmentation de la taille de la vésicule biliaire, mais également une altération des paramètres cardiovasculaires, avec en particulier une hypotension et une tachycardie réflexe chez le chien.

Concernant le gonflement de la vésicule biliaire, plusieurs inconnues persistent, en ce qui concerne la toxicité potentielle d'un tel effet. En particulier, cette augmentation de volume s'oppose-t-elle au fonctionnement normal de l'organe, et est-elle accompagnée d'un risque augmenté de développement de calculs biliaires ? Quoiqu'il en soit, même s'il me semble prématuré de considérer cet effet comme un frein dans le développement d'agonistes de TGR5, il est évident qu'il ne participe pas à l'amélioration d'un diabète, et peut donc être considéré comme un effet indésirable potentiel, au sens littéral du terme.

Concernant les modifications des paramètres hémodynamiques, elles représentent un risque potentiel plus évident, en particulier pour des patients diabétiques, dont les fonctions cardiovasculaires peuvent déjà être altérées par le diabète lui-même, ou par d'autres problèmes métaboliques concomitants. Leur apparition à des doses « thérapeutiques » est cette fois un obstacle bien plus conséquent au développement d'agonistes systémiques de TGR5, même si ces effets sont décrits uniquement chez le chien à l'heure actuelle

Nous avons donc décidé d'adopter une stratégie tirant profit de la distribution tissulaire particulière de TGR5 : puisqu'il est exprimé dans les cellules entéroendocrine L intestinales, présentes à la lumière du tube digestif, il doit être possible d'activer la sécrétion de GLP-1 en stimulant TGR5 à ce niveau, sans entraîner d'autres effets, à condition d'empêcher le passage dans la circulation systémique de l'agoniste.

Le travail qui va être présenté dans ce manuscrit s'attache ainsi au développement d'agonistes de TGR5 à visée topique intestinale afin d'évaluer le potentiel de ce récepteur en tant que cible thérapeutique pour le diabète de type 2 et ses complications métaboliques.

III. Stratégies d'obtention de composés topiques intestinaux

A. Généralités

Avant toute chose, il me paraît nécessaire de définir le terme « topique ». Ce terme est employé par opposition au terme systémique, et désigne un composé dont l'action est limitée, restreinte, au lieu d'administration. Un composé topique intestinal est donc un composé dont la voie d'administration prévue est la voie orale (ou rectale), et dont l'action pharmacologique est limitée au seul tractus gastro-intestinal.

Dans le cas où la cible pharmacologique du composé n'est pas exprimée ailleurs dans l'organisme, la théorie voudrait alors que peu importe la distribution du composé, son activité resterait restreinte au seul tractus digestif. Néanmoins, une distribution systémique augmente le risque d'effet off-target, puisqu'elle augmente l'exposition globale de l'organisme au composé. Quoiqu'il en soit, l'expression de TGR5 n'étant pas restreinte au tube digestif, il est nécessaire de mettre en place des stratégies de développement particulières.

L'étude des différentes étapes nécessaires à la distribution systémique d'un composé administré *per os* (Figure 22) permet de mettre en évidence deux étapes clés, à partir desquelles deux stratégies principales et potentiellement complémentaires peuvent être définies.

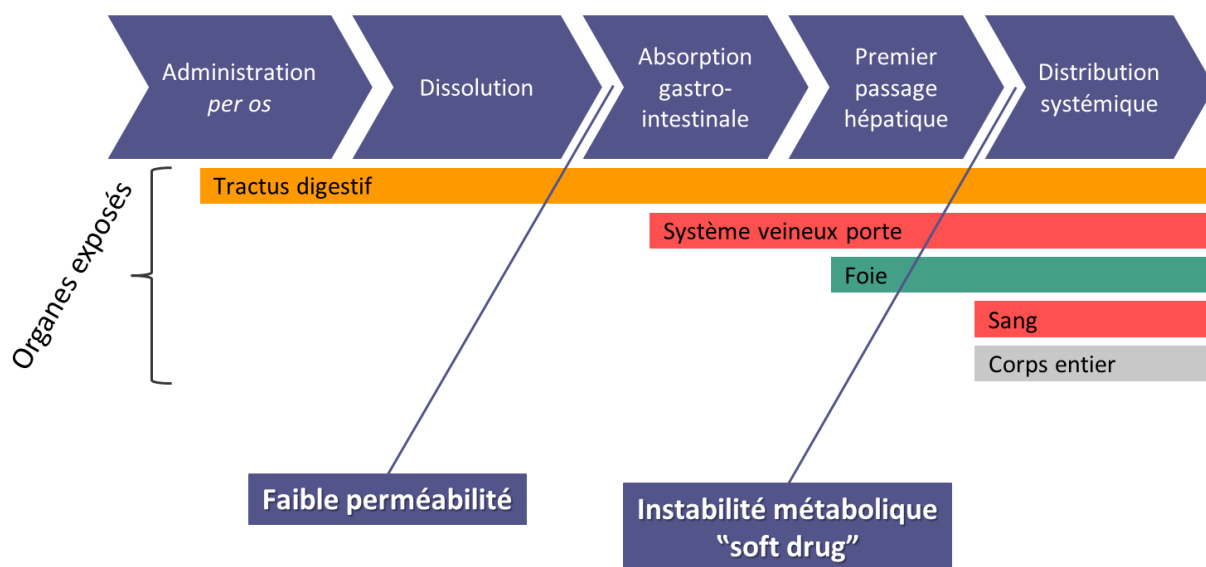


Figure 22 : Etapes nécessaires à la distribution systémique d'un composé après administration *per os*, organes exposés à chaque étape, et solutions possibles pour empêcher cette distribution.

1. L'instabilité métabolique

La première stratégie consiste en l'obtention de composés instables métaboliquement. En effet, la quasi-totalité du système sanguin irriguant l'intestin passe par le système veineux porte, puis par le foie, lieu principal de métabolisation des xénobiotiques, avant d'être

distribué à l'ensemble de l'organisme. En obtenant un composé instable métaboliquement, il est possible de limiter l'exposition de l'organisme. Cette stratégie est parfois appelée stratégie « soft-drug »⁶⁶ ou « ante-drug ». Elle présente l'avantage d'être assez simple à mettre en œuvre, puisque l'on ne cherche pas à s'opposer à une fonction de l'organisme, au contraire. De plus, grâce aux connaissances acquises au cours des dernières décennies concernant le métabolisme et ses mécanismes, dont la prise en compte dans les projets de chimie médicinale s'est massivement accrue, la prédiction de la stabilité métabolique d'un composé, ou en tout cas de son instabilité, est devenue plus sûre. La conception de composés instables métaboliquement s'en trouve donc facilitée. Cette stratégie a d'ailleurs été utilisée avec succès pour obtenir des inhibiteurs de MTP (microsomal triglycerides transfer protein) ciblant spécifiquement l'intestin, et dénués d'activité hépatique de par leur forte fragilité métabolique⁶⁷.

Cependant, cette stratégie souffre de trois problèmes majeurs. Tout d'abord, la métabolisation d'un composé n'entraîne pas systématiquement son inactivité. Le métabolite créé peut s'avérer être actif sur la cible du composé parent, et/ou actif sur une autre cible, voire toxique. De plus, comme on peut le remarquer sur la Figure 22, cette stratégie n'empêche pas l'exposition du système veineux porte, et du foie en lui-même. Or dans le cas de TGR5, on sait que celui-ci est exprimé dans certaines cellules du foie et du système biliaire. Enfin, la localisation de TGR5 dans la partie distale du tube digestif complique encore plus la mise en place de cette stratégie. En effet, la section la plus perméable de l'intestin est la partie proximale. Un soft drug dont l'absorption ne serait pas régulée atteindrait difficilement son site d'action, puisqu'il serait absorbé et métabolisé en amont. Cette stratégie apparaît donc comme peu adaptée à notre problématique dans laquelle nous ciblons la partie distale de l'intestin.

2. La faible perméabilité

Une deuxième approche consiste cette fois à obtenir des composés dont l'absorption par le tractus gastro-intestinal sera suffisamment faible pour ne pas entraîner une exposition systémique significative.

Le tractus digestif chez l'homme est long de 8.4 m en moyenne, dont 81% de la longueur est représentée par l'intestin grêle seul⁶⁶. Celui-ci est le lieu majoritaire de l'absorption des nutriments et des xénobiotiques absorbés par voie orale. Trois niveaux anatomiques de repliement et de villosités permettent d'atteindre une surface d'échange proche de 200 m² (l'équivalent de la surface d'un terrain de tennis). Au niveau cellulaire, les entérocytes sont les cellules qui occupent la grande majorité de la surface de contact avec la lumière intestinale, et qui sont responsables de la majeure partie des phénomènes d'absorption.

Lors de son absorption intestinale, un composé peut en effet emprunter plusieurs voies (Figure 23).

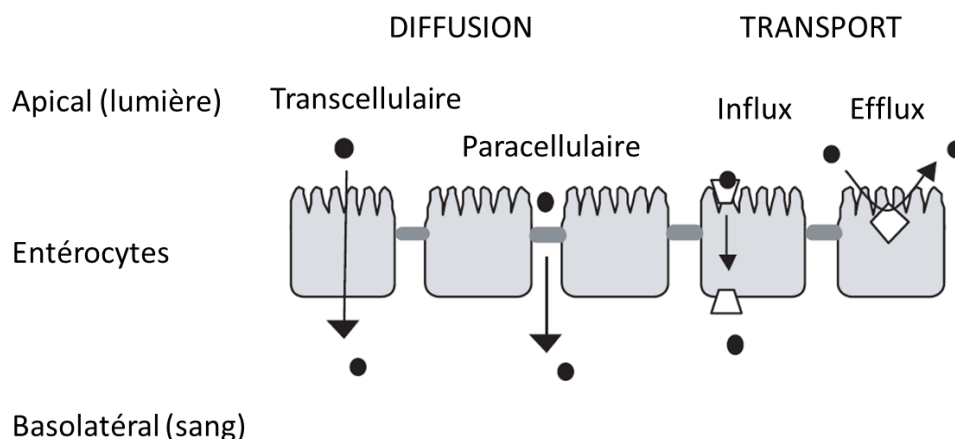


Figure 23 : Schéma des différents mécanismes impliqués dans la perméabilité intestinale⁶⁸

La voie paracellulaire correspond au passage entre les cellules, à travers les structures assurant la cohésion de l'épithélium : les jonctions serrées⁶⁶. Ces structures ne représentent que 0.01% de la surface d'échange disponible, et sont assez imperméables. Seuls des composés de petite taille ($MM < 250$ Da), polaires ($\text{LogP} < 0$), et plutôt cationiques sont capables de traverser ces structures.

La voie transcellulaire est la voie la plus couramment empruntée par les xénobiotiques⁶⁶. Les composés peu polaires ($0 < \text{LogP} < 5$) de taille moyenne ($300 < MM < 500$) et non chargés sont ceux pour qui la perméabilité par cette voie est maximale.

Enfin, les transports, qu'ils soient actifs ou facilités, d'influx ou d'efflux, impliquent systématiquement des structures protéiques permettant le passage de la membrane cellulaire. Parmi les transporteurs les plus courants au niveau intestinal on retrouve les protéines de la famille des ATP Binding Cassette (ABC) telles que la P-glycoprotéine (Pgp, ABCB1), la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCCG2), ou encore les Multidrug Resistance Proteins (MRP 1 à 6, ABCC1-6)⁶⁶. Ces protéines d'efflux limitent l'absorption intestinale de nombreux composés. Il faut également citer les protéines de la famille des Solute Carrier (SLC), majoritairement impliquées dans les phénomènes d'influx cette fois, avec notamment le peptide transporter (PEPT1, SLC15A1), l'organic anion polypeptide transporter (OATP2B1, SLCO2B1), ou encore l'organic cation/zwitterion transporter (OCTN1, SLC22A4). Pour l'ensemble de ces transporteurs, leur impact sur la perméabilité d'un composé est directement lié à leur capacité à interagir avec ce composé. Il est donc difficile de prévoir le comportement d'une série de composés vis-à-vis de ces différentes protéines, mais il est indispensable, dans le cadre d'une stratégie d'obtention de composés non-absorbés, de prendre en compte leur impact potentiel.

La biodisponibilité par voie orale est classiquement un paramètre que les chimistes médicaux cherchent à augmenter. Des études rétrospectives des relations entre les

paramètres physicochimiques de composés administrés à l'homme et leur biodisponibilité ont permis de définir un espace physicochimique favorisant la biodisponibilité orale. En particulier, la « règle des 5 » de Lipinski⁶⁹ a été une avancée conséquente dans ce domaine. Cette règle définit les quatre seuils suivants :

- Masse moléculaire (MM) > 500g/mol
- Coefficient de partage octanol/eau (cLogP) >5
- Nombre de donneurs de liaison hydrogène (HBD) >5
- Nombre d'accepteurs de liaison hydrogène (HBA) >10

Un composé validant deux de ces seuils ou plus présente un fort risque d'avoir une faible biodisponibilité par voie orale. Bien sûr, cette règle admet de nombreuses exceptions. D'autres paramètres ont également été décrits comme prédictifs de la biodisponibilité par voie orale, comme l'aire de surface polaire (PSA) ou le nombre de liaisons à libre rotation (RB).

Limiter l'absorption intestinale est cependant plus spécifique que limiter la biodisponibilité, puisque celle-ci résulte des phénomènes d'absorption et de métabolisme. En effet, la fraction biodisponible par voie orale (F) est la résultante de la fraction absorbée (F_a), de la fraction échappant au métabolisme intestinal (F_g) et de la fraction échappant au métabolisme hépatique (F_h)⁷⁰ selon la formule suivante : $F = F_a \cdot F_g \cdot F_h$. Une analyse fine de ces composantes et de leur impact sur la biodisponibilité a permis de montrer que La règle des 5 de Lipinski prédit majoritairement une faible F_a , et n'est pas prédictive de F_h ou de F_g (Figure 24).

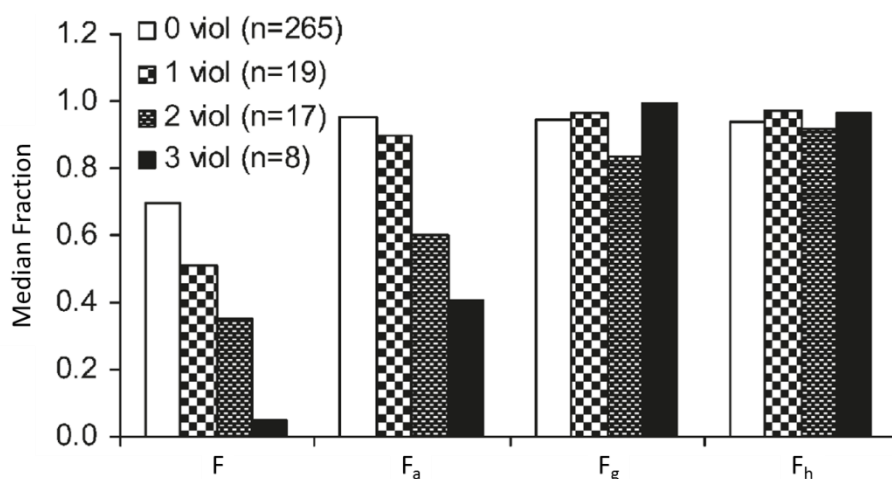


Figure 24 : relation entre le nombre de violation à la règle des 5 et les processus combinés et individuels⁷⁰.

Pour prévenir l'absorption intestinale, il est donc nécessaire d'obtenir un composé de haut poids moléculaire, et/ou possédant une polarité élevée. Ces caractéristiques moléculaires sont partagées par plusieurs molécules utilisées en thérapeutiques ou en cours d'évaluation pour traiter spécifiquement des pathologies gastro-intestinales, en particulier certaines

infections bactériennes ou fongiques, sans exposition systémique de l'organisme. Parmi elles, on peut citer la rifamixine, la vancomycine, la ramoplanine, ou encore la nystatine⁶⁶ (Figure 25).

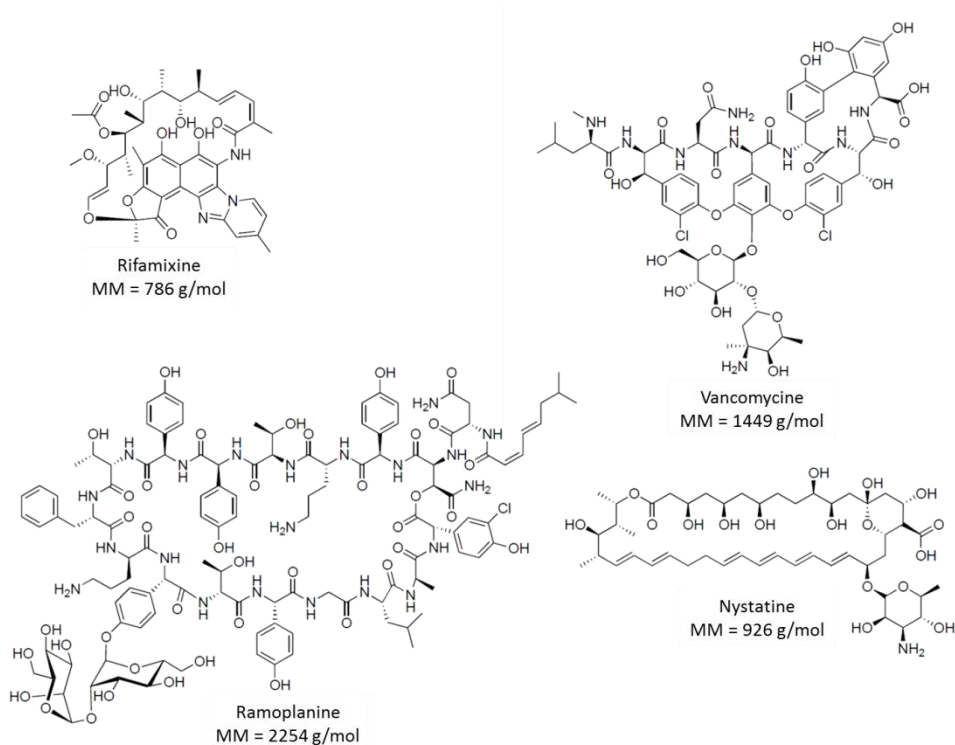


Figure 25 : Structures d'anti-infectieux non absorbés par le tractus gastro-intestinal.

B. Notion de kinétophore.

Dans le cas de TGR5, nous avons pu constater que les ligands décrits, naturels ou non, sont bien plus petits que les anti-infectieux décrits ci-avant, et possèdent des structures moins complexes. Il apparaît donc peu indiqué de mettre en place un projet de chimie médicinale sur des molécules de cette complexité, qui pourraient ne pas être adaptées de toute façon à l'activation de TGR5.

L'application du concept de kinétophore est beaucoup plus attrayante. Le kinétophore peut être défini comme une structure moléculaire conçue pour régir, définir, « porter » (du grec *phorós*, porteur), les propriétés pharmacocinétiques d'un composé, sans modifier les propriétés du pharmacophore⁷¹, qui _par métonymie_ est la structure moléculaire conçue pour régir les propriétés pharmacologiques d'un composé. Afin d'obtenir des agonistes topiques intestinaux, nous avons donc décidé de concevoir nos molécules comme la combinaison d'une structure active sur TGR5 et d'une structure polaire et/ou volumineuse.

Cette stratégie a également été employée en parallèle par plusieurs autres groupes (issu du Shanghai Institute of Materia Medica, ou encore les sociétés Ardelyx et Exelixis) développant des agonistes de TGR5⁷²⁻⁷⁶.

L'optimisation d'une série d'agonistes de TGR5 a en effet été réalisée dans le but d'obtenir des composés actifs sur TGR5 mais non absorbés par le tractus digestif, afin de réduire l'exposition systémique. Ainsi, sur le composé SI2 qui présente une puissance de l'ordre du nanomolaire sur les récepteurs humain et murin, un groupement polaire a pu être ajouté pour donner le composé SI3 (Figure 26). Cette modification entraîne une légère perte d'activité (EC_{50} de l'ordre de 20 nM), et une baisse de la perméabilité membranaire, mesurée par un test sur cellules Caco2^a (P_{app} 10 fois plus faible). Cette diminution de la perméabilité n'est toutefois pas suffisante pour empêcher une exposition systémique, et une accumulation dans la vésicule biliaire a même été observée, ce qui explique l'effet obtenu sur cet organe⁷² (Figure 26).

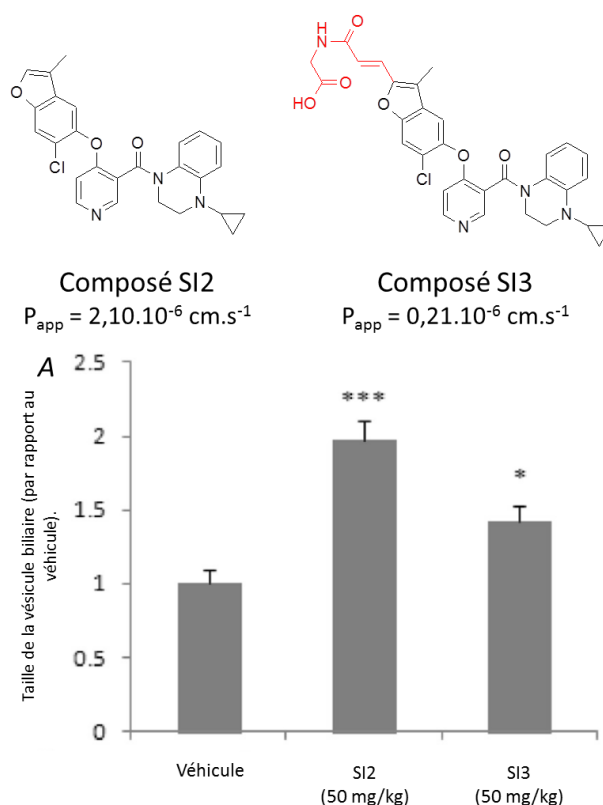


Figure 26 : Structure et caractérisation des agonistes de TGR5 SI2 et SI3⁷².

La partie rouge de SI3 peut être considérée comme le kinétophore. P_{app} désigne la valeur de la perméabilité membranaire apical vers basal obtenue sur cellule Caco2.

A. Evaluation de l'effet d'une administration unique des composés SI2 et SI3 sur le volume de la vésicule biliaire (Longueur x largeur x épaisseur) chez des souris ICR.

^a Signification des valeurs de perméabilité obtenues lors d'un test Caco2 :

0- $2 \cdot 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$: perméabilité faible

2- $20 \cdot 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$: perméabilité moyenne

20- $60 \cdot 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$: perméabilité forte

Ces résultats ne sont toutefois pas surprenants. Premièrement, le groupement acide carboxylique, bien que diminuant la lipophilie, n'est pas connu pour bloquer l'absorption intestinale. Deuxièmement, c'est un groupement chimique décrit comme favorisant l'excrétion par voie biliaire⁷⁷, ce qui va à l'encontre de l'objectif recherché. Cependant, un point intéressant de cette étude est l'identification d'une position sur la structure active qui tolère l'ajout de groupements volumineux et polaire sans impact net sur l'activité.

Ces données ont donc été utilisées pour concevoir le dimère SI5 à partir du composé SI4 (Figure 27). L'activité de ce dimère est toujours de l'ordre de 20 nM, mais sa perméabilité membranaire a encore été diminuée⁷³ ($P_{app} = 0.04 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$). Il présente d'ailleurs une exposition systémique très faible (concentration plasmatique de l'ordre de l' EC_{50} sur cellules sur-exprimant TGR5), mais est toujours capable d'induire une sécrétion de GLP-1 *in vivo*, ainsi qu'un effet sur l'hyperglycémie postprandiale suite à une épreuve d'OGTT, tout en n'ayant que très peu d'effet sur la taille de la vésicule biliaire (Figure 27). Ces résultats montrent qu'il est possible de déclencher la sécrétion de GLP-1 avec une exposition limitée au tractus gastro-intestinale.

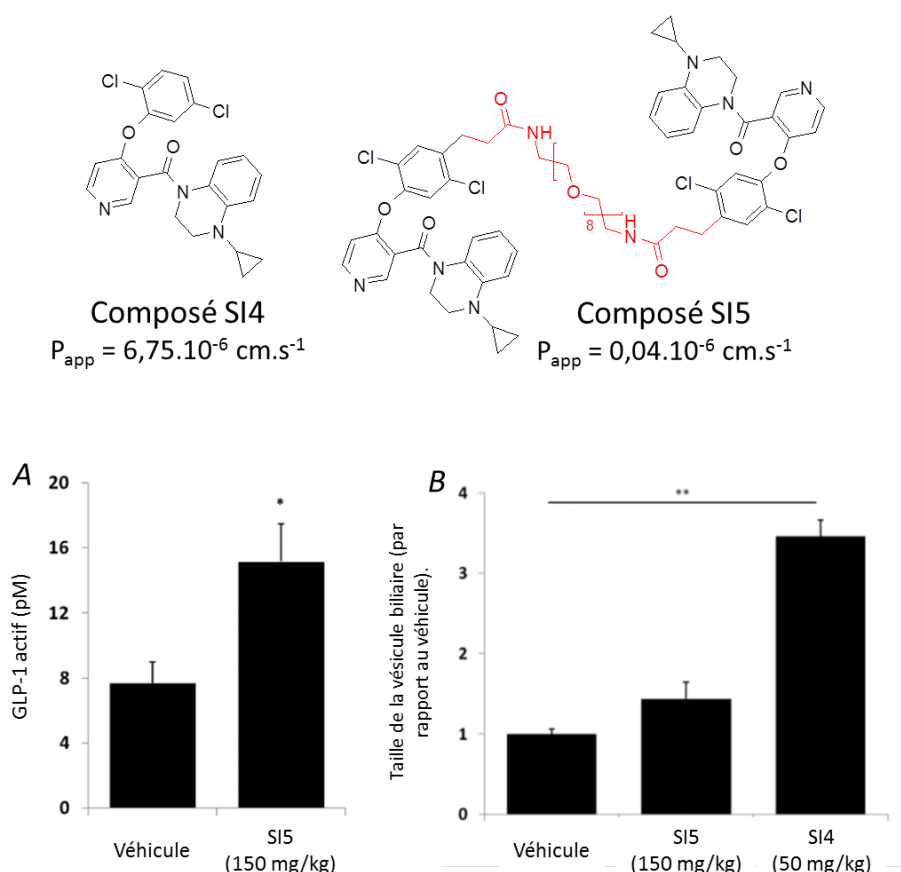


Figure 27 : Structure et caractérisation des agonistes de TGR5 SI4 et SI5⁷³.

La partie rouge de SI5 peut être considérée comme le kinétophore. P_{app} désigne la valeur de la perméabilité membranaire apical vers basal obtenue sur cellule Caco2.

A. Evaluation de la sécrétion de GLP-1 après administration unique du SI5 chez des souris ICR

B. Evaluation de l'effet d'une administration unique des composés SI4 et SI5 sur la taille de la vésicule biliaire (Longueur x largeur) chez des souris ICR.

C. Conclusion

A l'initiation de ces travaux, l'objectif était de réaliser la preuve de concept chez l'animal de l'intérêt de l'utilisation d'agonistes topiques intestinaux de TGR5 dont l'administration puisse conduire à une augmentation de la sécrétion de GLP-1 qui soit bénéfique dans la gestion de l'hyperglycémie chez des sujets diabétiques, sans entraîner d'autres effets non voulus tels que des troubles hémodynamiques ou des modifications de la fonction de la vésicule biliaire. Nous avons décidé de concevoir des composés constitués d'une structure capable d'activer TGR5, le pharmacophore, d'une structure permettant de réduire l'absorption intestinale, le kinetophore, ces deux structures pouvant être reliées par un lien chimique, le linker, ou directement branchées l'une sur l'autre (Figure 28).

Le développement de cette stratégie nécessite de répondre à plusieurs questions :

- QUOI ?

Quelle structure utiliser comme agoniste de TGR5 ? Nous cherchons à obtenir des agonistes puissants, sélectifs, et originaux.

Quel kinetophore utiliser pour parvenir au meilleur contrôle de l'absorption intestinale ?

- OÙ ?

Quelle(s) position(s) sur le pharmacophore utiliser pour brancher le kinetophore sans perte d'activité notable ?

- COMMENT ?

Est-il nécessaire d'utiliser un linker, si oui, quelle structure chimique choisir ?

- QUAND ?

Quel est le timing idéal pour observer les différents effets d'agonistes topiques intestinaux chez l'animal.

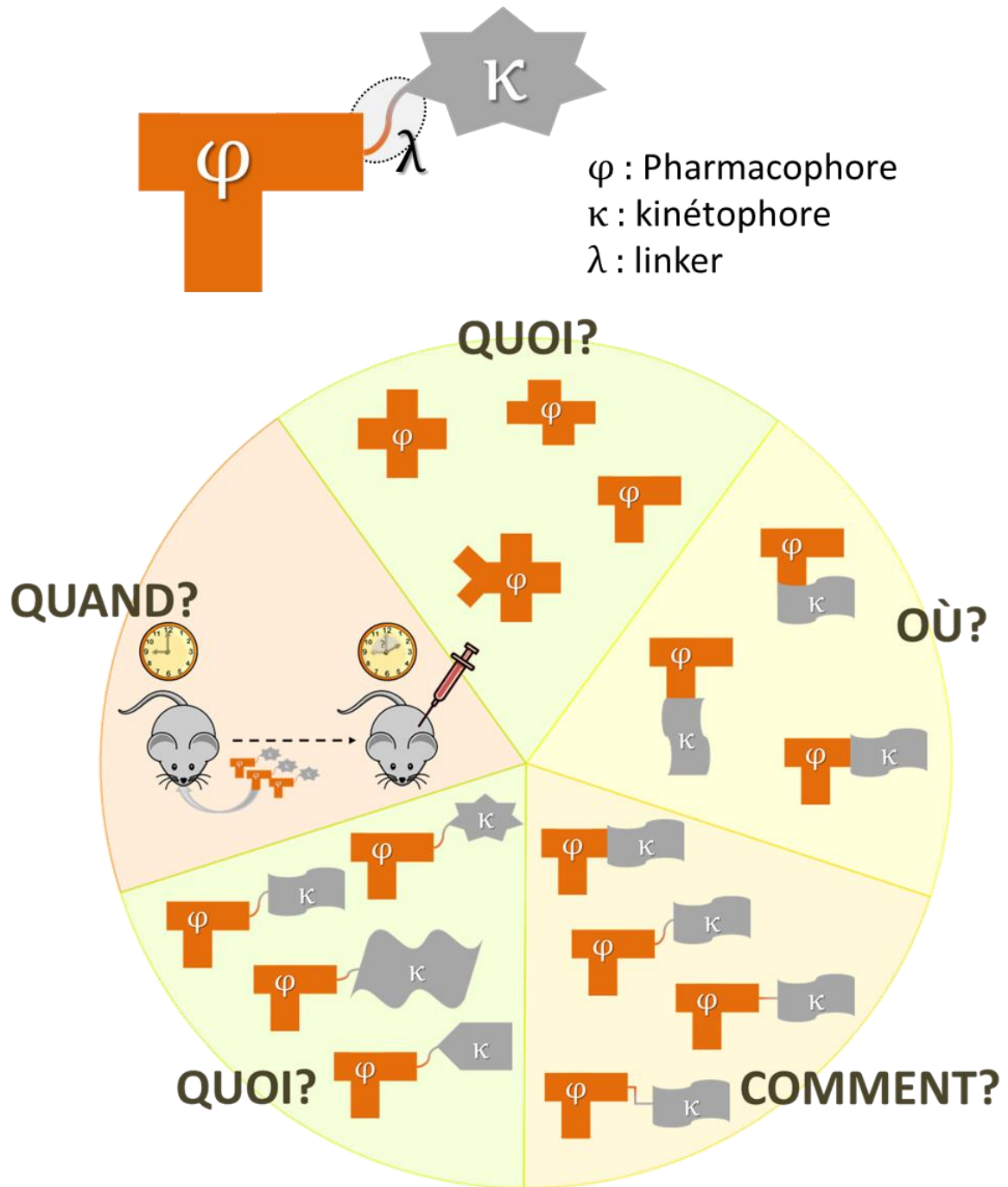


Figure 28 : Structure schématique d'un agoniste de TGR5 à visée topique intestinale et stratégie de développement.

IV. Optimisation du pharmacophore

Dans l'objectif d'aboutir à des candidats médicaments, il est nécessaire d'obtenir des composés qui soient puissants, sélectifs, et originaux. C'est dans cette optique qu'a été réalisée l'optimisation du groupement pharmacophore, à partir d'une série chimique identifiée suite à un criblage à haut débit sur le récepteur TGR5 humain.

A. Criblage à haut débit sur le récepteur TGR5

Avant mon arrivée sur ce projet, un criblage haut-débit avait été réalisé sur le récepteur TGR5 humain. 5 familles chimiques différentes avaient été identifiées suite à ce criblage, et pour différentes raisons, trois ont été engagées dans un processus d'optimisation « hit to lead ».

1. Principe du test primaire de transactivation.

Je vais tout d'abord présenter le principe du test du criblage qui a été développé avec nos collaborateurs biologistes de l'unité Inserm U1011 « Récepteurs nucléaires, Maladies Cardiovasculaires et Diabète ». Ce test a par la suite été réutilisé tout au long du projet comme test primaire, afin de mesurer par des expériences de dose-réponse la puissance et l'efficacité des analogues synthétisés. C'est un test de transactivation du récepteur TGR5 exprimé artificiellement dans une lignée de cellules HEK (Human Embryonic Kidney) transfectées transitoirement par un plasmide codant pour le récepteur TGR5 (humain dans le cadre du screening, humain ou murin pour les expériences de dose-réponse) et par un autre plasmide codant pour la luciférase, et dont le promoteur est un élément de réponse à l'AMPc (CRE) (Figure 29).

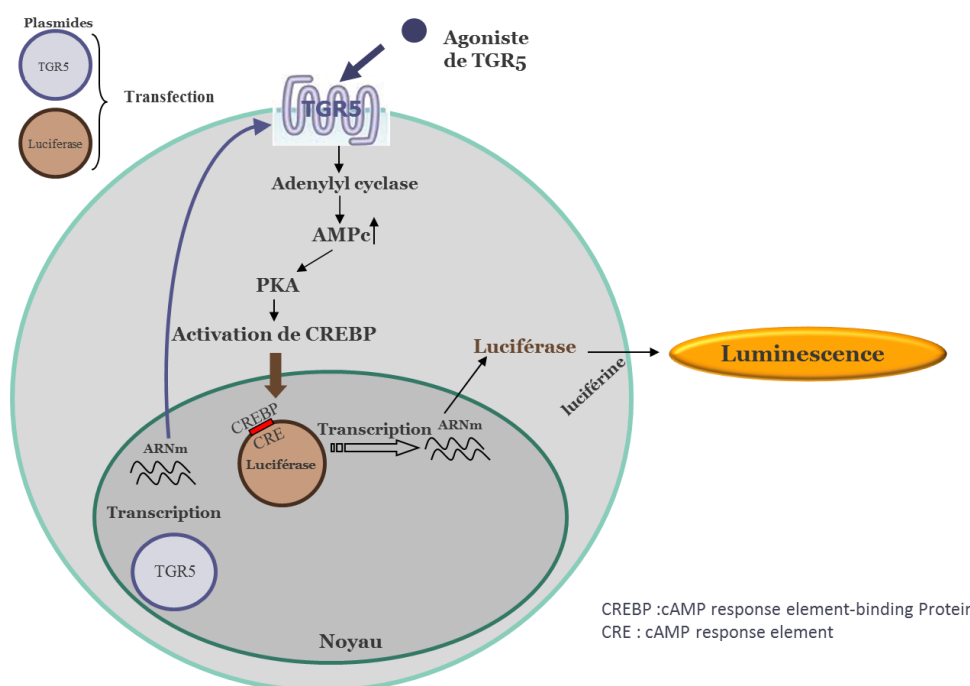


Figure 29 : schéma du test cellulaire de transactivation utilisé lors du criblage à haut débit et pour les expériences de dose-réponse.

Ainsi, plus le composé testé est un agoniste puissant et efficace de TGR5, plus l'augmentation de la concentration d'AMPC intracellulaire est importante, plus le gène de la luciférase va être transcrit puis traduit, et plus l'intensité lumineuse mesurée après ajout de luciférine sera élevée. Cette propriété permet de déterminer la puissance d'un composé (*i.e.* sa concentration efficace à 50 %, l' EC_{50}) et son efficacité (*i.e.* le maximum de l'activité obtenue, rapportée à l'activation maximale obtenue avec un agoniste de référence, ici le LCA à 10 μ M) en réalisant des expériences de dose-réponse (Figure 30).

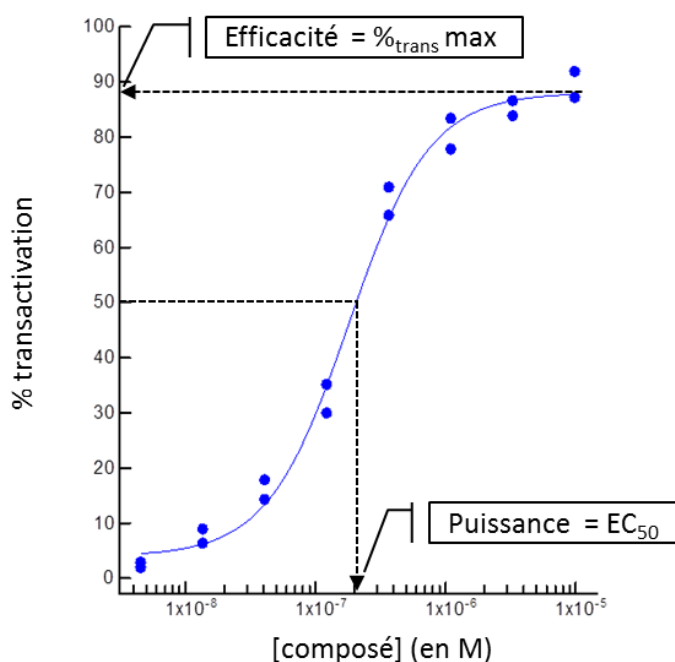


Figure 30 : Courbe théorique obtenue lors d'une expérience de dose-réponse et paramètres obtenus.

2. Résultats du criblage

Parmi les 20 500 composés testés sur ce criblage, 5 familles chimiques ont été identifiées et confirmées comme actives sur le récepteur TGR5. Parmi les trois séries qui ont été développées par la suite, le travail présenté ici concerne la série nommée série 5. Lors de mon arrivée, un travail important de synthèse d'analogues des hits obtenus (composés **1** et **2**, Figure 31) sur cette série avait déjà été réalisé. Dans la littérature, un brevet⁷⁴ déposé par la compagnie Exelixis décrit des agonistes de TGR5 dont le noyau central rappelle le noyau central des composés de la série 5 (Composé **3**, Figure 31). Dans le but d'évaluer la proximité biologique de ces structures vis-à-vis du récepteur TGR5, les composés **3**, **4**, **5** et **6** avaient été synthétisés et testés sur les récepteurs humain et murin. Une perte totale d'activité avait alors été observée pour les composés **4** et **5**, dont la restriction conformationnelle par un cycle à 6 sommets apparaissait donc comme inadaptée. En revanche, la relative flexibilité permise par le cycle à 7 pour le composé **6** avait permis un regain d'activité, qui restait cependant assez faible.

Optimisation du pharmacophore

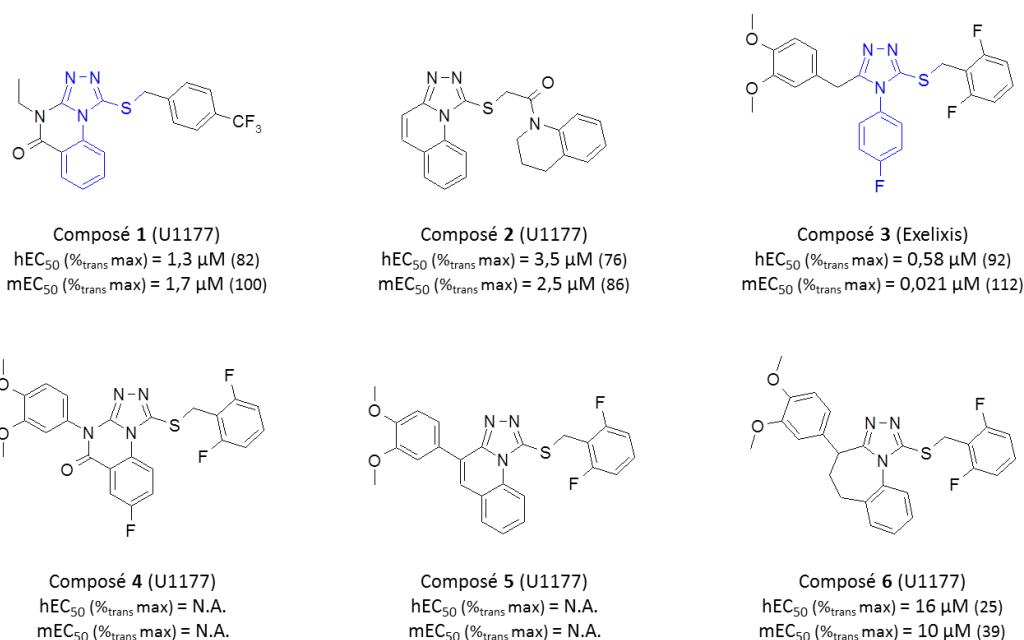


Figure 31 : Structure des composés ayant servi de point de départ à l'optimisation du pharmacophore et activité sur les récepteurs TGR5 humain et murin.

hEC_{50} = concentration efficace à 50% sur le récepteur humain.

mEC_{50} = concentration efficace à 50% sur le récepteur murin.

% $_{trans}$ max = Pourcentage maximal de transactivation.

N.A. = non actif.

B. Série des 3-amino-5-thio-[1,2,4]triazoles

1. Rationnel de conception des composés

Une autre stratégie pour explorer les relations structure-activité entre les composés de la série 5 et ceux décrit par Exelixis consistait en un remplacement isostérique carbone vers azote en s'inspirant du composé **3** et de ces dérivés dont le composé **3'** et le **3''**. J'ai appliqué cette stratégie à mon arrivée, avec pour objectif d'obtenir les composés **7** et **8** (Figure 32).

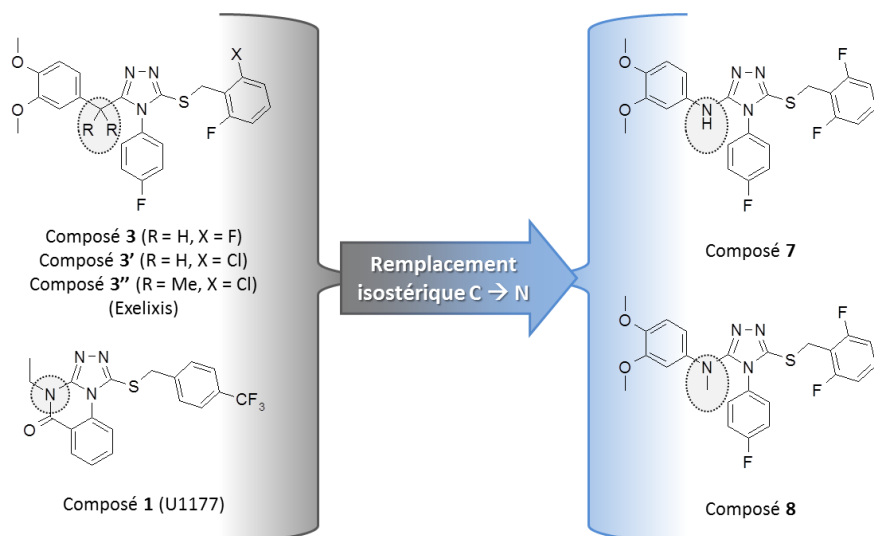


Figure 32 : Conception des composés 7 et 8 par remplacement isostérique à partir des composés 1, 3, 3' et 3''.

La stratégie de remplacement isostérique ou bioisotérique est un outil de chimie médicinale classiquement utilisé dans l'exploration des relations structures-activité. Le remplacement carbone vers azote peut ainsi entraîner un gain d'activité⁷⁸, une perte d'activité^{79, 80}, ou une amélioration des paramètres pharmacocinétiques⁷⁹. Ce remplacement peut aussi permettre de faciliter une voie de synthèse à but exploratoire⁸¹, d'éliminer un centre asymétrique⁸⁰, et d'introduire de l'originalité^{80, 81}, tout en minimisant potentiellement l'impact pharmacologique et pharmacocinétique.

2. Synthèse

a) Cyclisation du motif carbamothioyl hydrazinecarboxamide

La synthèse du motif 3-amino-5-thio-[1,2,4]triazole (Schéma 1) est peu décrite dans la littérature. L'une des voies de synthèse consiste en l'addition d'un semicarbazide sur un isothiocyanate pour obtenir le motif carbamothioyl hydrazinecarboxamide, qui subit ensuite une étape de cyclodéshydratation dans la soude pour donner le triazole voulu (Schéma 1)⁸²⁻⁸⁴. La fonction thiol peut ensuite être alkylée _dans notre cas benzylée_ par substitution nucléophile.

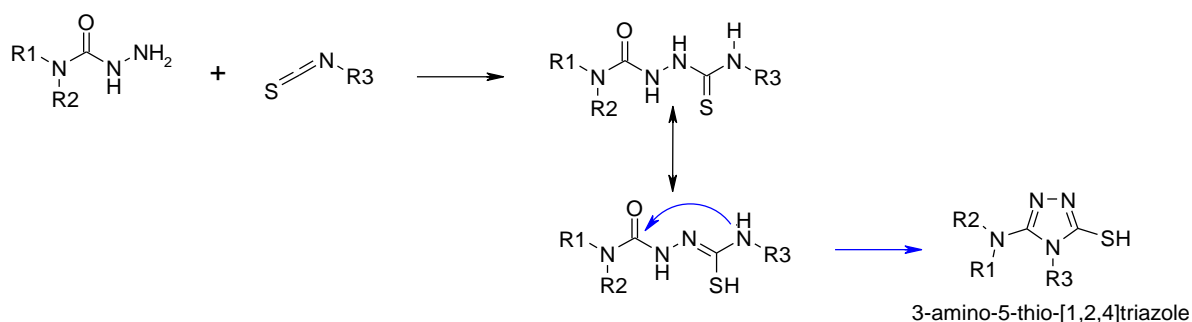


Schéma 1 : Obtention des 3-amino-5-thio-[1,2,4]triazoles par cyclisation du motif carbamothioyl hydrazinecarboxamide

Pour le composé **7**, l'obtention de l'intermédiaire carbamothioyl hydrazinecarboxamide (composé **7c**) a été réalisée selon la suite réactionnelle suivante avec un rendement global de 60 % sur les trois étapes (Schéma 2) :

Optimisation du pharmacophore

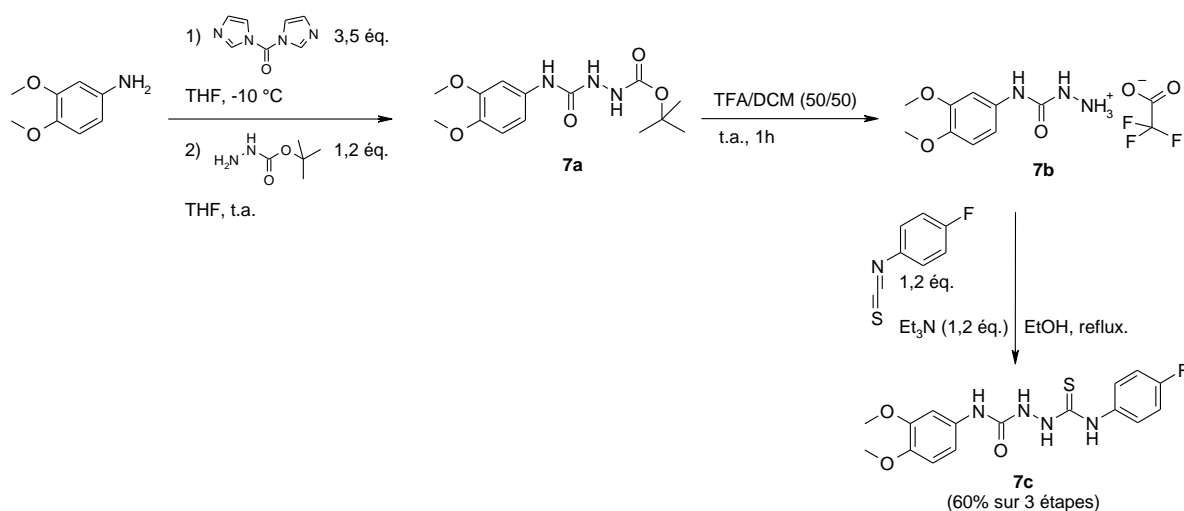


Schéma 2 : Obtention du composé **7c**.

- Une réaction de couplage one-pot séquentielle entre la 3,4-diméthoxyaniline et le tert-butoxycarbonylamine en utilisant le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) comme donneur de carbonyl^{85, 86} a permis l'obtention du composé **7a**.
- Une déprotection du groupement tert-Butoxycarbonyl (tBoc) en milieu acide (Acide trifluoroacétique/Dichlorométhane 1/1 (V/V)) a ensuite permis l'obtention du semicarbazide **7b**.
- Ce semicarbazide a été utilisé pour obtenir le composé **7c** par addition en milieu basique sur le 4-fluoroisothiocyanate.

Les conditions décrites dans la littérature pour obtenir le 3-amino-5-thio-[1,2,4]triazole voulu (composé **7d**) à savoir soude 2N à reflux pendant 2h, n'ont cependant pas permis d'obtenir le composé souhaité, mais ont conduit à la formation d'un 3-amino-5-hydroxy-[1,2,4]triazole (composé **7d'**, Schéma 3).

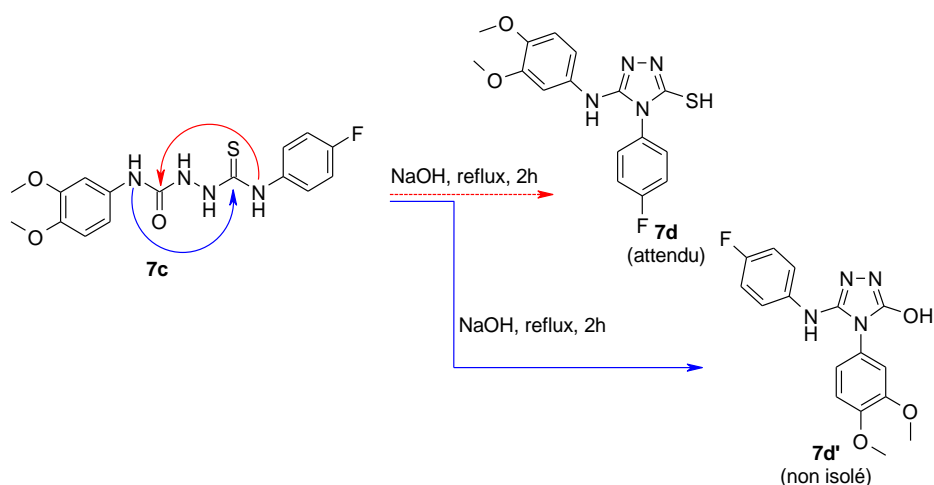


Schéma 3 : Cyclisation du composé **7c**.

Le produit de cyclodeshydratation (flèche rouge) attendu (**7d**) n'a pas été obtenu. C'est le produit de cyclisation/élimination de H_2S (flèche bleue) qui a été obtenu (**7d'**).

Malgré la régiosélectivité inattendue de cette réaction de cyclisation, nous avons tenté d'appliquer le même schéma réactionnel pour la synthèse du composé **8**. En effet, dans le cas du composé **8**, l'azote porté par le cycle diméthoxyphényle est méthylé, ce qui empêche théoriquement une cyclisation équivalente à celle observée pour le composé **7d'**.

Le composé **8d** a donc été obtenu par la suite réactionnelle suivante (Schéma 4) :

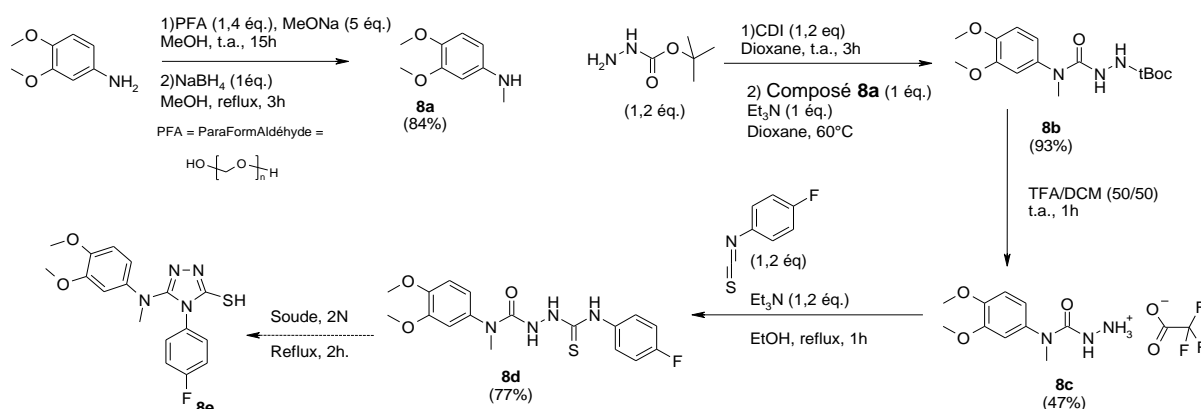


Schéma 4 : Obtention du composé **8d**. Le composé **8^e** n'a pas pu être obtenu.

- Après une monométhylation par amination réductrice en catalyse basique⁸⁷,
- une réaction de couplage one-pot séquentielle entre la 3,4-diméthoxy-N-méthylaniline et le tertbutylcarbamate en utilisant le 1,1'carbonyldiimidazole (CDI) comme donneur de carbonyle a permis l'obtention du composé **8b**. Il est à noter que dans le cas présent, l'ordre des réactifs a été inversé par rapport à la réaction de formation du composé **7a**⁸⁸.
- Puis, comme précédemment, une déprotection du groupement tert-Butoxycarbonyl (tBoc) en milieu acide (TFA/DCM 1/1 (v/v)) a ensuite permis l'obtention du semicarbazide **8c**.
- Ce semicarbazide a enfin été utilisé pour obtenir le composé **8d** par addition en milieu basique sur le 4-fluoroisothiocyanate.

Une nouvelle fois, les conditions décrites dans la littérature pour obtenir le 3-amino-5-thio-[1,2,4]triazole voulu (composé **8e**), à savoir soude 2N à reflux pendant 2h, n'ont pas permis d'obtenir le composé souhaité. Une hydrolyse du composé **8d** donnant la N-méthylaniline **8a** a même été observée. D'autres conditions de cyclisation ont été tentées, sans plus de succès, et ne seront pas détaillées ici. L'une d'entre elle a cependant abouti à des résultats intéressants. En effet, voyant que la cyclodéshydratation n'avait pas lieu, j'ai envisagé l'utilisation d'agents déshydratants, tel que le trichlorure de phosphore (POCl₃). Dans POCl₃, à température ambiante, le composé **8d** a effectivement donné un produit dont la

masse molaire obtenue par analyse LCMS correspondait à un produit de déshydratation que nous supposons être le composé **8e** (Schéma 5).

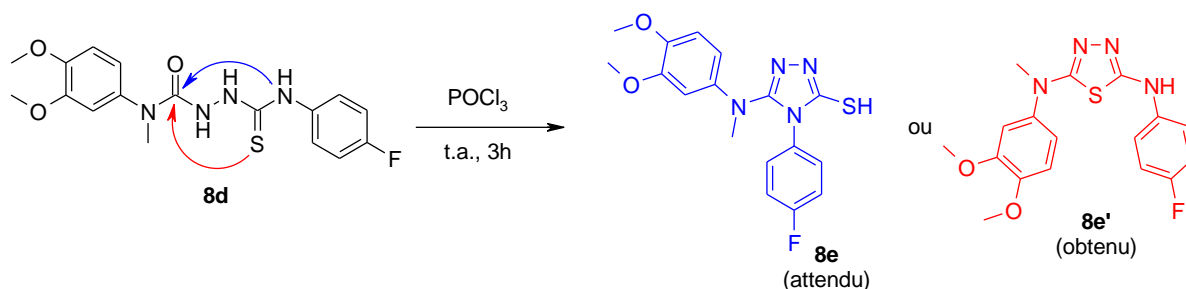


Schéma 5 : Cyclocondensation du composé **8d** en présence de POCl_3 et produits possibles.

La réaction était régiospécifique, puisqu'un seul produit était obtenu. Cependant, il était nécessaire de valider la structure du composé obtenu. Les expériences RMN du proton, de détection des couplages scalaires, et de détection des couplages spatiaux, n'ayant pas permis de valider ou d'invalider une des deux structures, une cristallographie par diffraction des rayons X a été réalisée par des collaborateurs de l'Unité de Catalyse et de Chimie du Solide (UCCS, CNRS UMR 8181). Il s'est malheureusement avéré que le produit obtenu n'était pas le 3-amino-5-thio-[1,2,4]triazole souhaité mais plutôt le 2,5-diamino-[1,3,4]thiadiazole (composé **8e'**) (Figure 33).

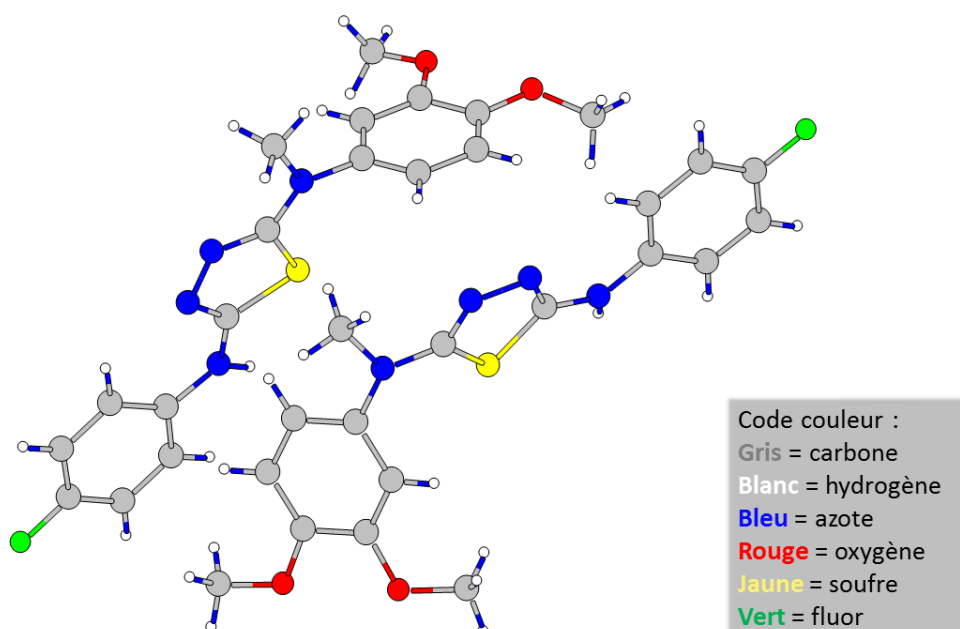


Figure 33 : Structure radiocristallographique du composé **8e'** obtenu lors de la réaction de cyclocondensation du composé **8d**.

b) Obtention du motif 5-amino-4-(4-fluorophényl)-4H-[1,2,4]triazole-3-thiol

Une autre stratégie consistait à obtenir le motif aminothiotriazole **7e** (Schéma 6) puis à venir fonctionnaliser successivement l'atome de soufre puis l'atome d'azote exocyclique. Bien que plus avantageuse en terme de nombre d'étapes que la précédente voie de synthèse, cette stratégie présente le désavantage de nécessiter une étape d'arylation de l'atome d'azote extracyclique. Or, dans le cas des aminotriazoles, très peu de littérature existe concernant ce type de réaction.

L'obtention du 5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phényl)-4H-[1,2,4]triazol-3-ylamine (composé **7f**, Schéma 6) a été réalisée en deux étapes⁸⁹ : formation du motif aminothiotriazole central par une réaction one-pot séquentielle entre le 4-fluorophénylisothiocyanate et l'aminoguanidine, suivie par une substitution nucléophile stéréospécifique sur l'atome de soufre (Schéma 6).

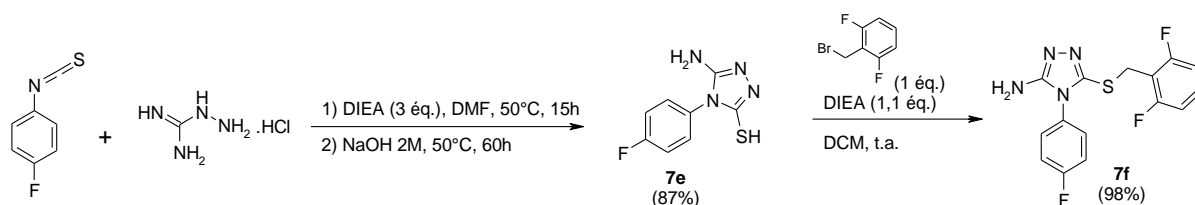


Schéma 6 : Obtention du composé **7f**.

Pour l'étape d'arylation de l'azote, plusieurs types de réaction de couplage métallo-catalysé ont été tentés, tels que des couplages de type Finkelstein/Ullman-Goldberg⁹⁰ (catalyse au Cu^(I)), ou les couplages de type Buchwald-Hartwig⁹¹ (catalyse au Pd⁽⁰⁾). Dans aucun des cas, nous n'avons pu observer l'apparition du produit attendu. L'utilisation des conditions de couplage de type Chan-Lam-Evans a elle donné des résultats intéressants.

Les couplages de type Chan-Lam-Evans sont des couplages cuprocatalysés au Cu^(III) entre un acide boronique d'une part, et un oxygène de phénol, un soufre de thiophénol ou un azote d'aniline d'autre part⁹²⁻⁹⁴ (Schéma 7). Ces réactions se déroulent à température ambiante, sous air, voir sous dioxygène, en présence d'un piège à eau tel que le tamis moléculaire 4Å, sur plusieurs jours à quelques dizaines d'heure. A noter, les hétérocycles azotés nucléophiles (imidazoles, pyrazoles, triazoles, tétrazoles, benzimidazoles, et indazoles) sont également décrits comme de bons substrats de la réaction⁹³.

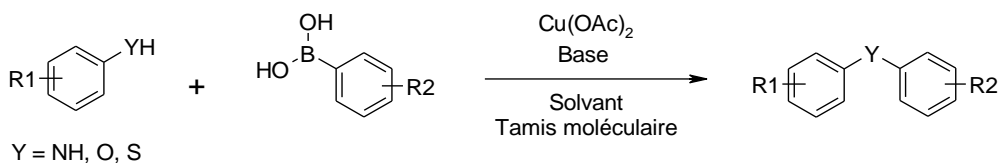


Schéma 7 : Schéma général de la réaction de Chan-Lam-Evans.

Bien que les conditions soient très variables et à adapter selon les substrats, quelques règles peuvent être retenues en terme de réactivité. L'acétate de cuivre II ($\text{Cu}(\text{OAc})_2$) est l'espèce de choix pour le catalyseur. Les solvants les plus efficaces sont, en premier lieu le dichlorométhane, puis au choix la N-méthylpyrrolidone (NMP), le 1,4-dioxane, le tétrahydrofurane (THF) ou le diméthylformamide (DMF). La triéthylamine (TEA) permet en général d'obtenir de bons rendements, mais la pyridine peut lui être préférée dans certains cas, comme par exemple avec les hétérocycles azotés.

Peu de publications décrivent une réaction de Chan-Lam-Evans sur un motif 4H-[1,2,4]triazol-3-ylamine. Nous nous sommes basés sur un protocole décrivant l'arylation de cette structure, et dont le substrat d'arylation diffère du notre par la position et la nature de la substitution du triazole. Cependant, ce protocole nous est apparu séduisant car il permet l'accès à un composé pour lequel la N-arylation via une méthode de type Buchwald-Hartwig s'est avérée inefficace. Un premier essai nous a permis d'obtenir des résultats encourageants : en mettant le composé **7f** en présence d'acide 3,4-diméthoxyphénylboronique, d'acétate de cuivre II, de pyridine et de tamis moléculaire 4 Å, dans le dichlorométhane, le produit voulu (composé **7**) s'était formé. Malheureusement, le produit de diarylation (composé **7g**) était le produit majoritaire (Schéma 8), et la conversion n'était pas complète.

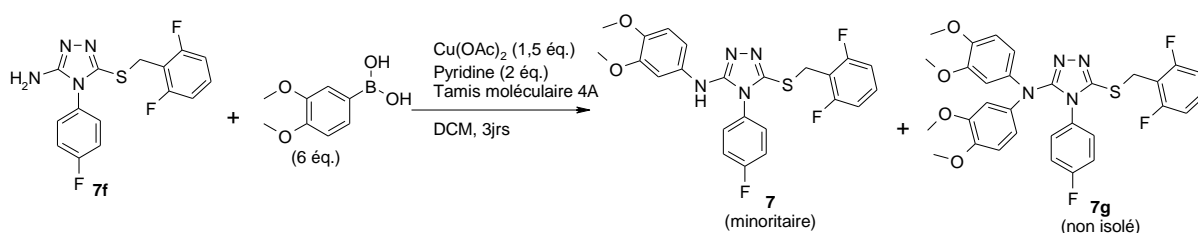


Schéma 8 : Réaction de Chan-Lam-Evans sur le composé **7f**.

Nous avons donc décidé d'effectuer une étape d'acétylation de l'azote, avant de réaliser à nouveau le couplage. En présence de triéthylamine, de pyridine, d'acétate de cuivre II, de tamis moléculaire 4 Å dans le dichlorométhane, le couplage entre l'acide 3,4-diméthoxyphénylboronique et le composé **7h** a donné le composé **7i** avec un rendement de 50% (Schéma 9).

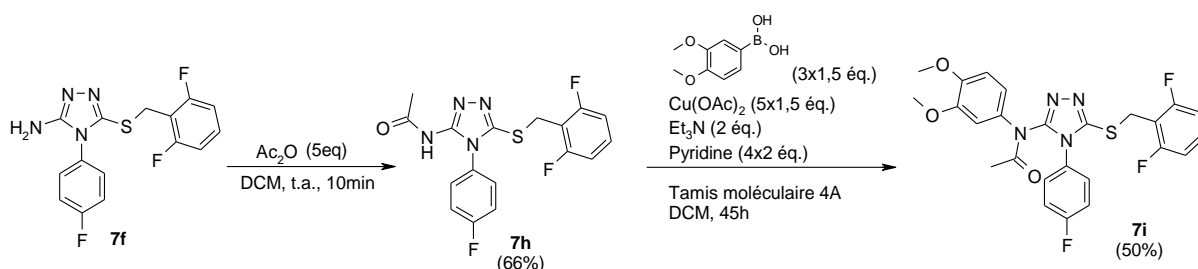


Schéma 9 : Obtention du composé **7i** par réaction de Chan-Lam-Evans.

La désacétylation a été réalisée dans un mélange Ethanol/Chlorure d'acétyle 4/1 (V/V) permettant de générer des ions H^+ *in situ* (Schéma 10), puis une recristallisation dans un mélange isopropanol/méthanol a permis d'obtenir le composé **7** avec un rendement de 57%, soit 16% sur les 5 étapes.

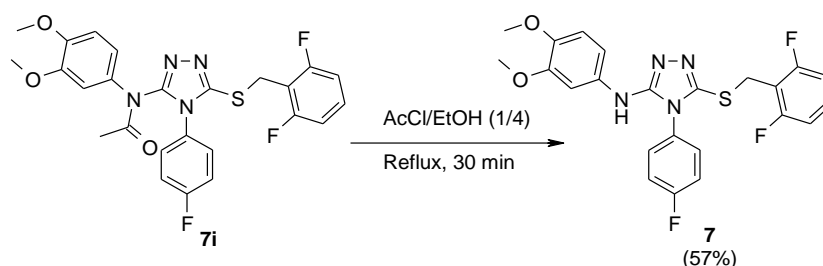


Schéma 10 : Désacétylation du composé **7i**.

De manière analogue, le composé **8** a pu être obtenu en deux étapes à partir du composé **7f** (Schéma 11):

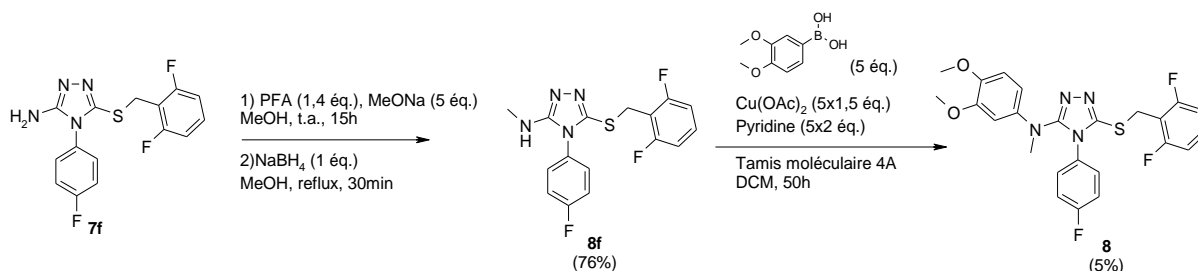


Schéma 11 : Obtention du composé **8** à partir du composé **7f** par méthylation puis couplage de Chan-Lam-Evans.

- L'azote exocyclique a tout d'abord été monométhylé par amination réductrice en catalyse basique⁸⁷.
- Ce même azote a ensuite été arylé par réaction de Chan-Lam-Evans en présence d'acide 3,4-diméthoxyphénylboronique, de pyridine et de tamis moléculaire 4 Å dans le dichlorométhane pour donner le composé **8** avec un rendement de 5% (le rendement faible est majoritairement dû à une difficulté de purification, la conversion ayant été totale).

3. Activités sur le récepteur TGR5

La puissance et l'efficacité des composés **7**, **8**, et de certains intermédiaires de synthèse ont été mesurées sur le test primaire par nos collaborateurs biologistes de l'unité Inserm U1011 « Récepteurs nucléaires, Maladies Cardiovasculaires et Diabète » sur les récepteurs humain et murin. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après (Tableau 1).

Optimisation du pharmacophore

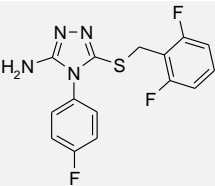
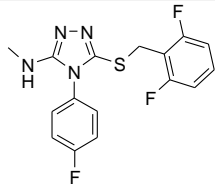
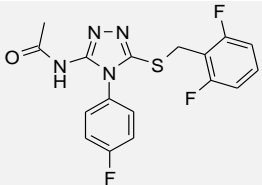
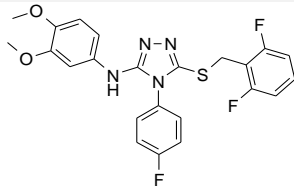
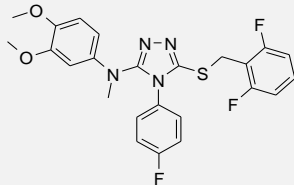
Composé	Récepteur TGR5 Humain		Récepteur TGR5 murin	
	EC ₅₀ (μM)	% trans. max	EC ₅₀ (μM)	% trans. max
 7f	N.C.	<10%	N.C.	<10%
 8f	64,7	58%	21.5	60
 7h	N.C.	<10%	N.C.	<10%
 7	N.C.	<10%	N.C.	<10%
 8	4,3	56%	0,18	90%

Tableau 1 : Activité des composés 7 et 8 et de certains intermédiaires de synthèse.

EC₅₀ = concentration efficace à 50%.

%_{trans} max = Pourcentage maximal de transactivation.

N.C. = non calculé.

Plusieurs conclusions ont été tirées de ces résultats :

Premièrement, mise à part l'activité résiduelle du composé **8f**, seul le composé **8** s'est montré actif sur le récepteur TGR5. De manière inattendue, le composé **7** s'est lui avéré complètement inactif. Ceci contraste fortement avec les composés décrits dans le brevet déposé par la compagnie Exelixis, et en particulier avec les composés **3'** et **3''**, qui sont décrits comme ayant tous les deux une activité inférieure à 100 nM sur le récepteur humain (Figure 34). Cette particularité renforce l'originalité des composés obtenus. Ensuite, comme pour le composé **3**, l'activité sur le récepteur humain est plus faible que celle sur le récepteur murin. Enfin, bien que la présence de l'hydrogène sur l'azote extracyclique soit délétère pour l'activité du composé **7** (en comparaison du composé **8**), elle semble tolérée dans le cas du composé **8f**.

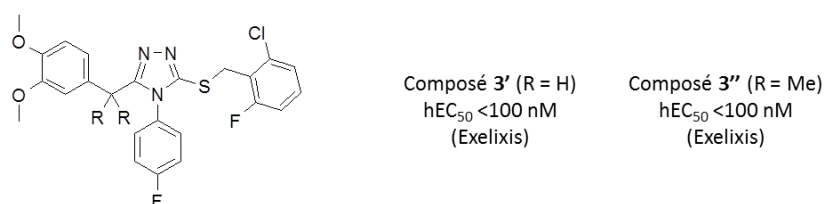


Figure 34 : Structurer et activité des composés **3'** et **3''**.

Nous avons donc décidé de réaliser une exploration des relations structure-activité de cette série chimique, en synthétisant des analogues modifiés sur la partie gauche, afin d'investiguer le rôle des substituants du cycle aromatique du composé **8**, ainsi que la possibilité d'utiliser des groupements alkyles sur cet azote extracyclique pour gagner en activité (Figure 35).

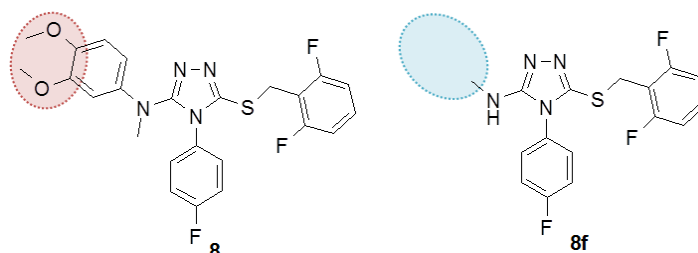


Figure 35 : Objectifs de l'exploration des relations structure-activité de la partie gauche des composés **8** et **8f**.
 En rouge : Impact des substituants du cycle aromatique.
 En bleu : Obtention d'analogues possédant des substituants plus volumineux.

5 analogues ont donc été synthétisés à partir du composé **7f** en suivant la voie de synthèse décrite pour le composé **8** (Schéma 11), en réalisant soit uniquement la première étape d'amination réductrice avec différents aldéhydes, soit en réalisant la méthylation puis le couplage de Chan-Lam-Evans avec différents acides boroniques. Le Tableau 2 présente les résultats d'activité obtenus avec ces analogues sur le test primaire pour les récepteurs humain et murin.

Optimisation du pharmacophore

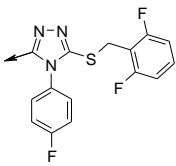
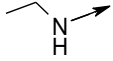
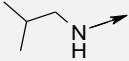
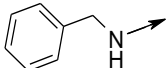
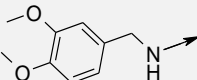
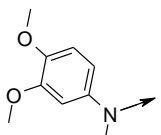
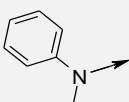
Composé	Récepteur TGR5 Humain		Récepteur TGR5 murin	
	EC ₅₀ (μM)	% trans. max	EC ₅₀ (μM)	% trans. max
 8f	64	58%	21,5	60%
 9	57	25%	25	62%
 10	N.C.	<15%	12.2	52%
 11	N.C.	<15%	3.3	85%
 12	0.51	77%	0.41	86%
 8	4.3	56%	0.18	89%
 13	N.C.	<15%	N.C.	<15%

Tableau 2 : Activités des analogues des composés 8 et 8f.

EC₅₀ = concentration efficace à 50%.

%_{trans} max = Pourcentage maximal de transactivation.

N.C. = non calculé.

On peut observer ici l'importance du cycle aromatique et des groupements méthoxy, dont la présence est responsable d'une nette augmentation de l'activité (composé **11** vs composé **12**, composé **8** vs composé **13**). On remarque également l'activité intéressante du composé **12**, qui possède la particularité d'être équipotent sur le récepteur humain et murin. L'ensemble des résultats obtenus jusqu'ici conforte l'intérêt que présente cette série dans le développement d'agonistes du récepteur TGR5.

Malgré les différences dans les relations structure-activité obtenues par rapport à celles déduites du brevet Exelixis, il était intéressant de continuer à explorer cette série chimique, afin d'évaluer si la position utilisée par Exelixis pour brancher un kinétophore pouvait être transposée sur notre série. Nous avons donc décidé de synthétiser de nouveaux analogues du composé **8**, en particulier en modifiant le scaffold hétérocyclique central, pour passer du triazole à l'imidazole. En effet, cet hétérocycle semblait avoir été privilégié par rapport au triazole dans un second brevet⁷⁵ de la société Exelixis.

L'objectif de ce changement était double : d'une part tenter d'obtenir des composés plus puissants, mais aussi de passer à une voie de synthèse plus performante que celle des triazoles, dont les rendements étaient faibles et qui ne permettaient pas une diversification aisée des structures.

C. Série des 5-amino-2-thioimidazoles

1. Rationnel de conception des composés

Les premiers analogues synthétisés avaient donc pour objectif :

- de tenter d'aboutir à des composés plus puissants tout en approfondissant les relations structure-activité sur les différents cycles aromatiques, afin d'évaluer quelle position pourrait être utilisée pour brancher un kinétophore dans la stratégie d'obtention des composés non absorbés.
- D'aboutir à une voie de synthèse plus efficace et plus adaptée à un scale-up, dans l'optique de réaliser des évaluations de nos composés chez l'animal.

2. Synthèse de l'analogue imidazole du composé 8

Avant toute chose, il nous paraissait important d'obtenir l'analogue imidazole du composé **8**, afin de s'assurer que ce changement de scaffold hétérocyclique central était une stratégie à poursuivre.

Optimisation du pharmacophore

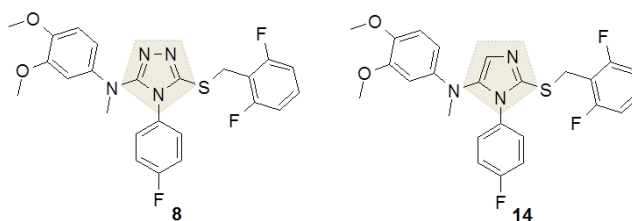


Figure 36 : Changement du scaffold hétérocyclique central : passage du triazole (8) à l'imidazole (14).
En gris : Scaffold hétérocyclique central.

La synthèse du noyau hétéroaromatique 5-amino-2-thioimidazole est très peu décrite dans la littérature : un article de 1980⁹⁵ décrit l'obtention de 2-thio-5-morpholinoimidazoles (Schéma 12 A.), mais cette voie de synthèse ne peut être utilisée ici. Un brevet déposé par Syngenta⁹⁶ décrit lui la synthèse de 5-amino-2-méthanesulfanylimidazoles à partir de N-acétamidoisothiourées par conversion de l'amide en thioamide via l'utilisation du réactif de Lawesson puis cyclisation dans la soude 4N (Schéma 12 B.) (cette synthèse a d'ailleurs récemment été publiée⁹⁷).

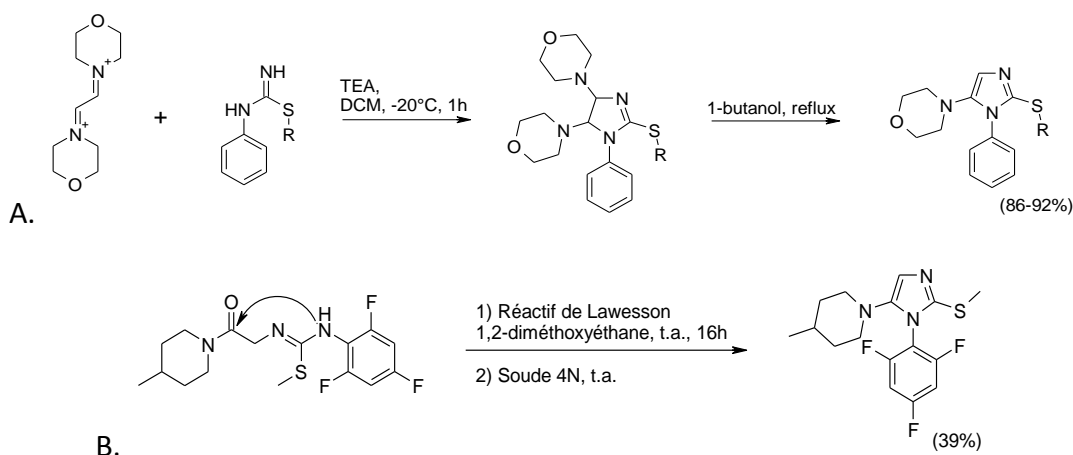


Schéma 12 : Synthèses décrites de motifs 5-amino-2-thioimidazoles.

A. Synthèse de 2-thio-5-morpholinoimidazoles⁹⁵.

B. Synthèse de 5-amino-2-méthanesulfanylimidazoles par cyclisation d'acétamidoisothiourées⁹⁷.

La synthèse du composé **14** a donc été envisagée selon la voie de synthèse suivante (Schéma 13) :

Optimisation du pharmacophore

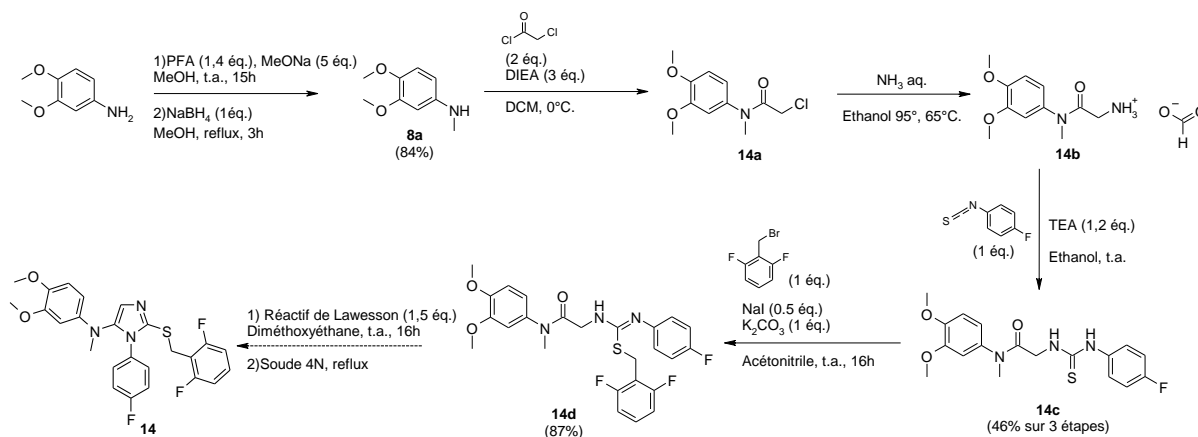


Schéma 13 : Voie de synthèse envisagée pour l'obtention du composé 14.

- L'acylation du composé **8a** par le chlorure de chloroacétyle à froid dans le dichlorométhane a permis l'obtention du composé **14a**.
- Une substitution nucléophile de l'atome de chlore par l'ammoniac dans l'éthanol à 95° a donné l'amine primaire **14b**.
- Celle-ci a été additionnée dans l'éthanol en milieu basique sur le 4-fluorophénylthiocyanate pour donner l'acétamidothiourée **14c**, avec un rendement de 46 % sur les trois étapes.
- Une substitution nucléophile par l'atome de soufre de la thiourée sur le bromure de 2,5-difluorobenzyle dans l'acétonitrile a permis l'obtention de l'acétamidoisothiourée **14d** avec un rendement de 87%.
- Cependant, l'utilisation du réactif de Lawesson pour obtenir le thioamide s'est avérée infructueuse.

Comme pour la synthèse du composé **8e** à partir du composé **8d** (Schéma 4, p- 84 -), nous cherchions ici à obtenir une cyclodéshydratation. L'utilisation d'un agent déshydratant a donc été envisagée. Dans le cas du composé **14d**, l'atome de soufre étant déjà alkylé, il ne peut pas réagir sur l'amide, ce qui limite le risque d'obtenir un isomère lors de la cyclisation, comme cela avait été observé avec l'obtention du composé **8e'**.

En premier lieu, la cyclodéshydratation a été tentée dans le trichlorure de phosphore (POCl_3) à 60°C. Bien que le produit attendu soit apparu, le milieu s'est rapidement dégradé. Nous avons donc décidé d'opter pour un agent déshydratant plus doux et pratique à utiliser, le T3P®, ou anhydride cyclique trimérique de l'acide propylphosphonique (Figure 37). Ce réactif, initialement utilisé comme agent de couplage peptidique, a suscité ces dernières années un intérêt particulier de par sa faible toxicité et sa facilité d'utilisation, en particulier lors de la phase de retraitement, où le diacide phosphonique formé au cours de la réaction est facilement éliminé par un lavage aqueux basique. Le T3P® a d'ailleurs été utilisé comme agent de cyclodéshydratation pour la synthèse d'hétérocycles tels que des oxadiazoles, des thiadiazoles⁹⁸, des benzothiazoles, des benzoxazoles et des benzimidazoles⁹⁹.

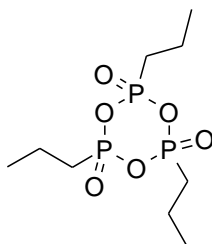


Figure 37 : Structure du T3P®.

La cyclodéshydratation conduisant au 5-amino-2-thioimidazole a ainsi pu être réalisée dans l'acétate d'éthyle à reflux, en utilisant 7,5 équivalents de T3P® à 50% dans l'acétate d'éthyle et 15 équivalents de triéthylamine, pour donner le composé **14** avec un rendement de 33%.

L'activité de ce composé a été évaluée sur le test primaire (Figure 38). La différence d'activité sur les récepteurs humain vs murin est conservée, mais le changement de scaffold triazole vers imidazole a permis un net gain de puissance, avec une EC₅₀ sur le récepteur murin de l'ordre du nanomolaire.

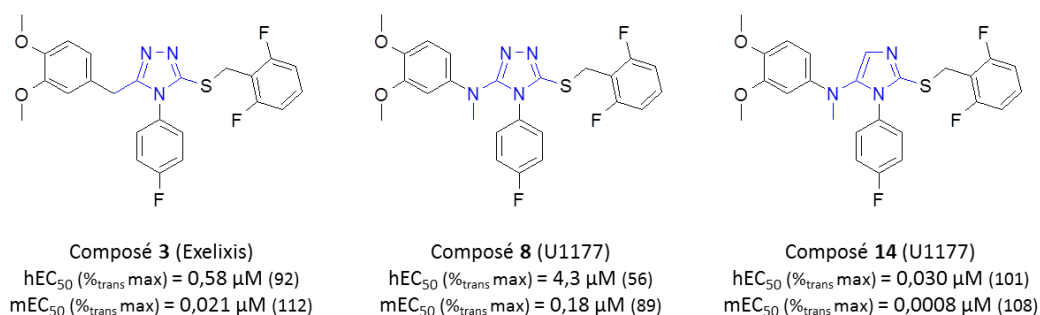


Figure 38 : Relations structure-activité sur les récepteurs humain et murin au cours des changements de scaffold centraux (composé **3**, **8** et **14**).

hEC₅₀ = concentration efficace à 50% sur le récepteur humain.

mEC₅₀ = concentration efficace à 50% sur le récepteur murin.

%_{trans} max = Pourcentage maximal de transactivation.

Ce gain d'activité était crucial pour la suite du projet, puisque l'ajout d'un kinétophore sur le pharmacophore n'est pas dénué d'un risque de diminution d'activité. De plus, il est classiquement décrit que la puissance d'un agoniste de récepteur couplé aux protéines G est surestimée lorsqu'elle est évaluée sur une lignée cellulaire sur-exprimant le récepteur, ce qui est notre cas. Ce phénomène a d'ailleurs été décrit pour le récepteur TGR5^{58, 100}.

Devant l'intérêt biologique évident que représentait la série des 5-amino-2-thioimidazoles, j'ai décidé d'optimiser la voie de synthèse permettant l'accès à ces composés, et en particulier la réaction de cyclodéshydratation en présence de T3P.

a) Optimisation de la réaction de cyclisation¹⁰¹

Cette réaction de cyclodéshydratation étant nouvelle, nous avons décidé d'optimiser les conditions réactionnelles. L'objectif ici était double : obtenir des conditions de cyclisation efficaces et explorer la portée de cette réaction, afin de faciliter l'accès aux 5-amino-2-thioimidazoles, qui représentent une série chimique attrayante pour notre projet.

L'optimisation a été réalisée avec le composé **15**, conçu pour ressembler à nos structures d'intérêt biologique, tout en restant simple chimiquement. Le groupement *p*-xyle sur l'atome de soufre a été préféré au benzyle pour faciliter l'analyse par spectrométrie RMN. Après l'avoir synthétisé selon la voie de synthèse utilisée pour le composé **14d** (cf Schéma 13 p- 94 -) en partant de la *N*-méthylaniline commerciale, et en utilisant le phénylisothiocyanate et le bromure de *p*-xyle, le composé **15** a été recristallisé dans un mélange méthanol/isopropanol. Sa structure a donc pu être confirmée (Figure 39), validant ainsi l'alkylation sélective du soufre.

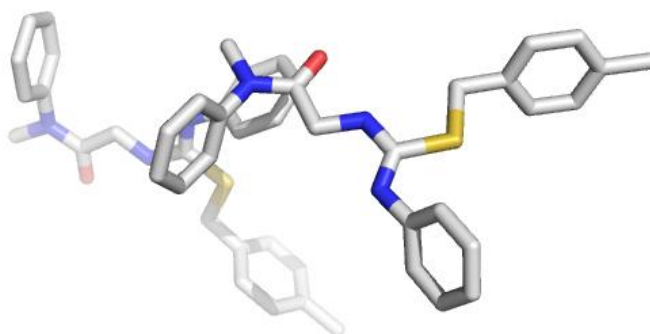


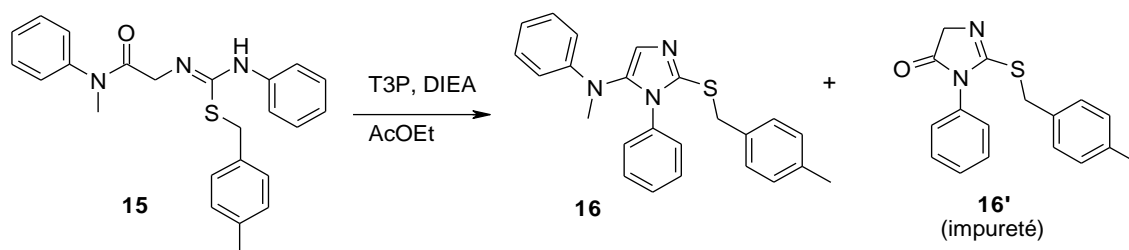
Figure 39 : Structure radiocristallographique du composé 15.

Légende : Gris = carbone. Bleu = azote. Rouge = oxygène. Jaune = soufre.

Nous avons réalisé l'optimisation en étudiant plusieurs paramètres :

- Le type chauffage (micro-onde vs chauffage thermique).
- La stœchiométrie de T3P®.
- La stœchiométrie de DIEA. Cette base avait été choisie suite à l'étude des conditions décrites dans la littérature pour d'autres cyclodéshydratations au T3P®.
- Le temps de chauffage.
- La température de réaction.

Optimisation du pharmacophore



Entrée	T3P ^a equiv.	DIEA equiv.	T(°C)	time	% 16 (% 16') ^{a,b}	Entrée	T3P ^a equiv.	DIEA equiv.	T(°C)	time	% 16 (% 16') ^{a,b}
<i>Chauffage micro onde</i>						<i>Chauffage classique</i>					
1	1	1	100	10 min	13 (8)	13	1	2	reflux	2h	2 (2)
2	1	1	100	20 min	14 (9)	14	1	2	reflux	4h	4 (13)
3	2	4	100	10 min	12 (nd)	15	1	2	reflux	8h	5 (40)
4	2	4	100	20 min	21 (nd)	16	1	2	reflux	24h	9 (83)
5	2	4	120	10 min	65 (9)	17	0	2	reflux	24h	0 (nd)
6	2	4	120	20 min	79 (14)	18	3	6	reflux	2h	23 (nd)
7	2	4	130	20 min	86 (11)	19	3	6	reflux	4h	30 (nd)
8	2	4	150	10 min	88 (12)	20	3	6	reflux	8h	48 (2)
9	3	6	150	10 min	96 (4)	21	3	6	reflux	24h	63 (6)
10	3	4.5	150	10 min	95 (5)	22	3+3 ^c	6+6 ^c	reflux	24h	80 (nd)
11	3	3	150	10 min	90 (10)						
12	1	2	150	10 min	62 (33)						

Tableau 3 : Optimisation des conditions de cyclodéshydratation du composé **15** en composé **16**.

^a Déterminé par LC-MS à 215 nm.

^b nd: non détecté

^c Addition de réactif en cours de réaction : T3P^a (3 équiv.) et DIEA (6 équiv.) ont été ajoutés après 8 heures de réaction.

L'entrée **1** a mis en évidence la formation du produit attendu, avec un faible taux de conversion, mais aussi d'une impureté, le composé **16'**. Celui-ci provient d'une réaction secondaire qui implique le départ de l'aniline, et non pas de l'oxygène (Schéma 14).

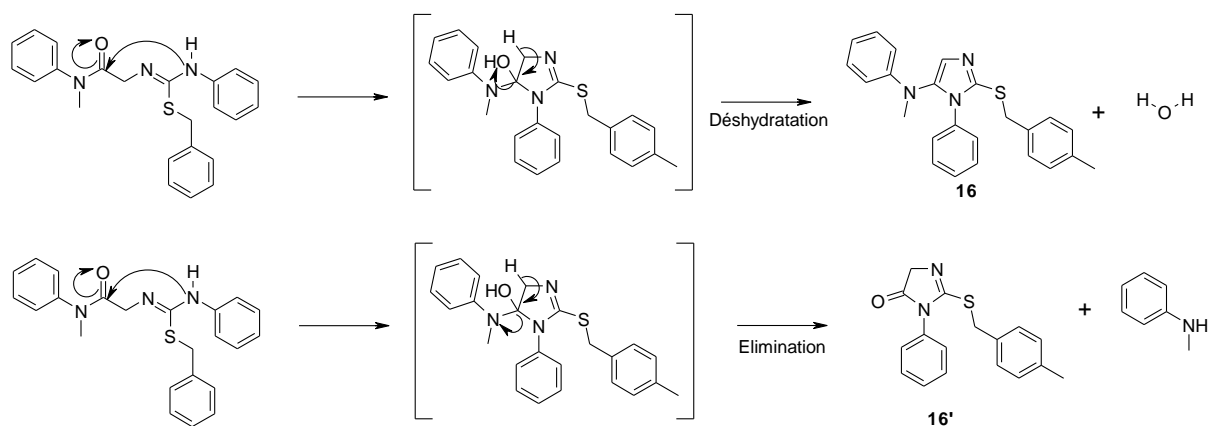


Schéma 14 : mécanisme proposé pour l'obtention du composé **16** et de l'impureté **16'**.

Pour tenter de régler ce problème, nous avons doublé le nombre d'équivalent de T3P® et le ratio DIEA/T3P® (entrée **1** vs **3**). En effet, le T3P® est connu comme un agent déshydratant et de plus, lors de son ouverture, un diacide est formé, libérant des protons dans le milieu, qui pourraient également favoriser le départ de l'aniline. Dans ces conditions, le produit **16'** n'est alors plus observé. Un temps plus long permet une légère augmentation de la conversion (entrée **3** vs **4**). Dans cette stœchiométrie, l'augmentation de la température est, elle, très efficace pour augmenter la conversion, cependant, l'impureté se forme à nouveau (entrées **5** à **8**). Augmenter à nouveau la stœchiométrie du T3P® permet d'obtenir une conversion totale avec un très faible ratio **16'/16** (entrée **9**). Les entrées **10** et **11** ont permis de vérifier la nécessité du rapport 2/1 DIEA/T3P®.

L'optimisation des conditions en chauffage classique a donné des résultats similaires. Le chauffage micro-onde s'avère cependant beaucoup plus efficace que le chauffage classique, notamment parce qu'il permet de travailler à des températures supérieures au point d'ébullition à pression atmosphérique de l'acétate d'éthyle. Cependant, l'étude des conditions de chauffage classique nous paraissait cruciale car elle apportait la possibilité d'utiliser cette technique pour des synthèses à plus grosse échelle, le volume réactionnel en micro-onde étant limité.

Enfin, l'évaluation de cette réaction en absence de T3P® a permis de montrer que la cyclodéshydratation n'était pas un simple processus thermique. En effet, ni le produit **16**, ni l'impureté **16'** n'ont été observés dans ces conditions (entrée **17**).

b) Exmplification de la réaction de cyclodéshydratation au T3P®

Les conditions de l'entrée **9** ont été retenues comme étant optimales pour réaliser la cyclisation. La réaction a donc été exemplifiée sur onze composés, avec des rendements variant de 31 à 98 % (Tableau 4).

n°	R1	R2	R3	R4	Rdt (%)
16	CH ₃				58
17	CH ₃				71
18	CH ₃				75
19	CH ₃				98
20	CH ₃				51

Optimisation du pharmacophore





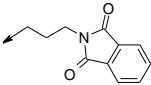


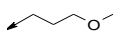
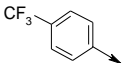

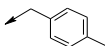
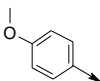

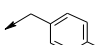
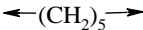

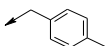
21	CH ₃			-CH ₃	77
22	CH ₃				61
23	CH ₃				92
24	CH ₃				70
25	CH ₃				50
26					31

Tableau 4 : Exemplification de la réaction de cyclisation.

Rdt = rendement de la réaction de cyclisation après purification du produit.

En R3, à la fois les groupements alkyles et aryles sont compatibles avec la réaction, y compris les groupements aromatiques encombrés (composé **19**). La présence de groupement électrodonneur ou électroattracteur sur le cycle aromatique en R3 n'a pas d'impact sur le rendement de la réaction (composés **17** et **18**). L'influence du substituant du soufre a été évaluée en utilisant des groupements aliphatiques (composés **21** à **23**) ou benzylique (composé **16**). Aucun effet n'a pu être déduit de ces variations. L'effet des substituant en R1 et R2 a ensuite été évalué. Différentes *N*-méthylaniline, portant des substituants électrodonneur ou électroattracteur ont ainsi été testées. Un groupement électro attracteur tel que le trifluorométhyle a donné un meilleur rendement (composé **24**, 70%) que le composé non substitué (**16**, 58%) ou portant un groupement méthoxy électrodonneur (composé **25**, 50%). Ainsi, en augmentant l'électrophilie du carbonyle de l'amide, un groupement électroattracteur est favorable à la réaction. A l'inverse, un groupement électrodonneur a tendance à s'opposer à la cyclisation. Enfin, la pipéridine a été utilisée comme amine aliphatique, et a donné le composé attendu avec un rendement faible de 31 % (composé **26**). Dans ce cas, l'élimination de l'amine pour donner le produit **16'** a été majoritaire (60% de rendement pour le produit **16'**).

L'ensemble de ce travail d'optimisation a été publié récemment dans Tetrahedron letters¹⁰¹.

3. Première série d'analogues

Au vu de l'amélioration notable apportée par le changement de scaffold hétérocyclique central et des résultats obtenus sur la série des triazoles, nous avons choisi d'explorer les relations structure-activité des 5-amino-2-thioimidazoles. Nous avons d'abord décidé d'évaluer l'importance de la disubstitution 3,4-diméthoxy sur le cycle de gauche (**A**), l'importance de la disubstitution 2,6-difluoro sur le cycle de droite (**C**), ainsi que l'importance du 4-fluoro sur le cycle du bas (**B**) et la tolérance à un encombrement stérique plus grand à

cette position. Enfin, certaines disubstitutions du cycle **B** conservant la substitution para-fluoro ont également été réalisées (Figure 40).

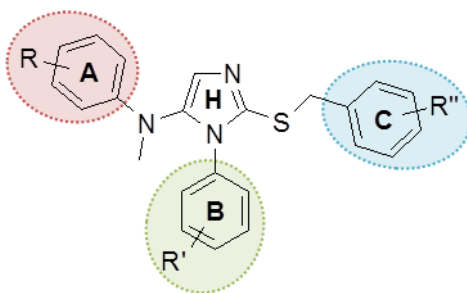


Figure 40 : Positions cibles de la première série d'exploration des relations structure activité de la série des 5-amino-2-thioimidazoles.

En rouge : Rôle des méthoxy sur le cycle A.

En vert : Substitution en para, disubstitution en para et ortho ou para et méta sur le cycle B.

En bleu : Substitution en ortho, ortho' à droite.

a) Synthèse

La voie de synthèse n°1 (Schéma 15), proche de celle utilisée pour le composé **14**, a été utilisée pour obtenir 13 analogues de ce composé, explorant les relations structure-activité sur les trois cycles aromatiques. Cette voie de synthèse en 6 étapes permet une diversification aisée des composés 5-amino-2-thioimidazole, en utilisant des réactifs simples tels que des anilines, des acides aminés, des isothiocyanates, et des dérivés benzyliques.

Optimisation du pharmacophore

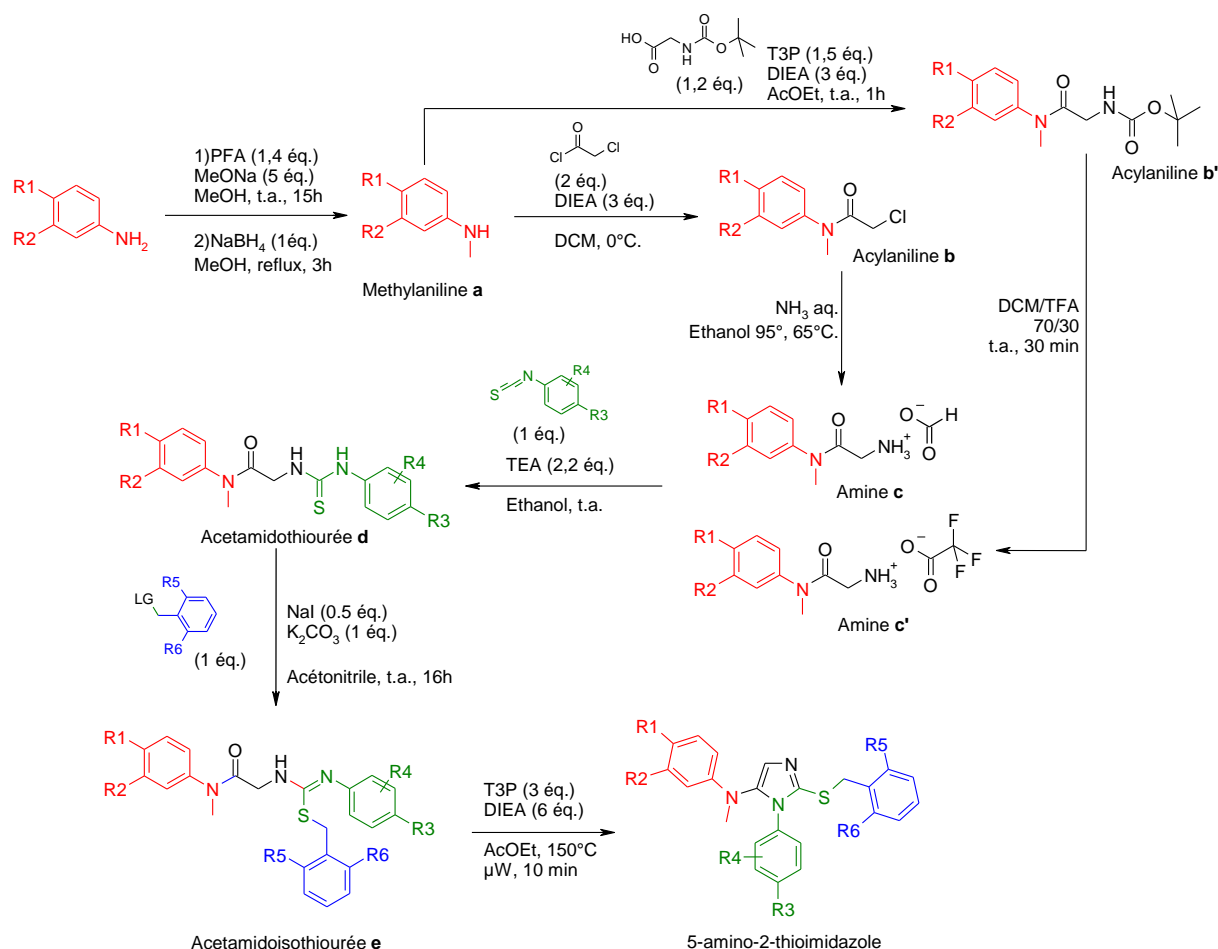


Schéma 15 : voie de synthèse générale n°1 des 5-amino-2-thioimidazoles.

- Lorsqu'elle n'est pas commerciale, la méthylaniline **a** est obtenue après monométhylation par amination réductrice en catalyse basique⁸⁷,
- L'acylation de la méthylaniline **a** par le chlorure de chloroacétyle à froid dans le dichlorométhane permet l'obtention de l'acylaniline **b**. Une substitution nucléophile de l'atome de chlore par l'ammoniaque dans l'éthanol à 95° donne accès à l'amine **c**. Cette enchainement de deux étapes pour parvenir à l'amine **c** a par la suite été optimisé. En effet, la substitution du chlore par l'ammoniaque nécessite l'utilisation de ce réactif en large excès, et génère des milieux réactionnels complexes, et des rendements moyens. Une voie alternative a donc été développée. La première étape est un couplage peptidique au T3P®, pour donner l'acylaniline **b'**. Cette réaction totale présente en plus l'avantage de permettre d'utiliser des acides aminés comme réactifs de départ, facilitant ainsi l'exploration de la position 4 de l'imidazole final. Le groupement tert-Butoxycarbonyl de l'acylaniline **b'** est ensuite retiré par déprotection en milieu acide (acide trifluoroacétique/dichlorométhane 30/70) pour donner l'amine **c'** de manière quantitative.
- L'amine **c** ou **c'** est ensuite additionnée dans l'éthanol en milieu basique sur un isothiocyanate pour donner l'acétamidothiourée **d**.

- Une substitution nucléophile par l'atome de soufre de la thiourée sur un dérivé benzylique activé dans l'acétonitrile permet l'obtention de l'acétamidoisothiourée **e**.
- Enfin, l'acétamidoisothiourée **e** est cyclisée en 5-amino-2-thioimidazole selon les conditions décrites ci-avant (Tableau 3, entrée 10).

Pour l'un des composés (**36**), le 4-fluoro-3-méthoxyphénylisothiocyanate n'étant pas commercial, la synthèse de la thiourée **36d** s'est effectuée à partir de l'amine **36c**, en utilisant le thiocarbonyl diimidazole (TCDI) et la N-méthyl-3,4-diméthoxyaniline⁸⁸.

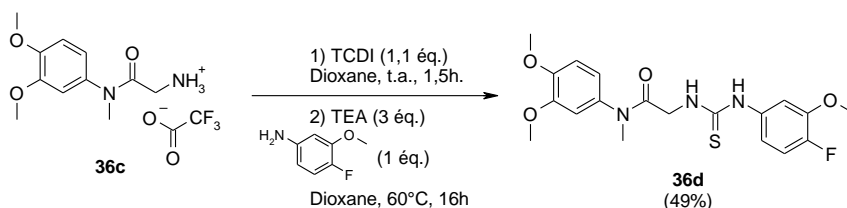


Schéma 16 : Synthèse de la thiourée dissymétrique **47d**.

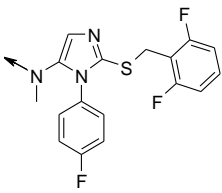
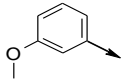
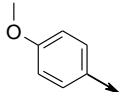
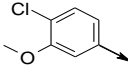
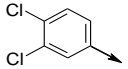
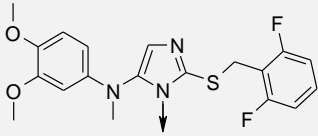
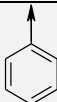
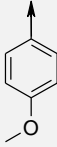
Cette voie de synthèse a permis d'obtenir 13 composés avec des rendements globaux variant de 2 à 25% sur les 6 étapes.

b) *Evaluation de l'activité*

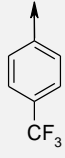
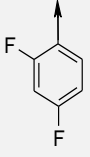
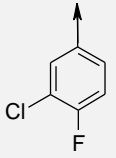
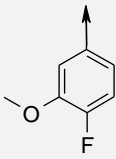
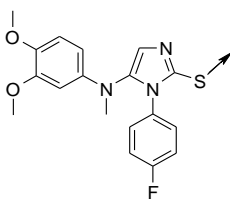
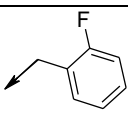
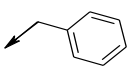
Le Tableau 5 présente les activités sur les récepteurs TGR5 humain et murin, sur le test primaire, des 13 analogues obtenus. Au vu de la puissance des composés, les puissances ont été exprimées en nanomolaire, et non en micromolaire comme c'était le cas pour les triazoles.

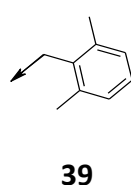
Composé	Récepteur TGR5 Humain		Récepteur TGR5 murin	
	EC ₅₀ (nM)	% trans. max	EC ₅₀ (nM)	% trans. max
 14	30	95%	0,8	102%

Optimisation du pharmacophore

<p><i>Modification de R1, R2</i></p> 				
 <p>27</p>	994	59%	91	118%
 <p>28</p>	1110	59%	141	116%
 <p>29</p>	880	57%	44	82%
 <p>30</p>	750	33%	507	116%
<p><i>Modification de R3, R4</i></p> 				
 <p>31</p>	250	93%	5,1	110%
 <p>32</p>	7700	55%	940	107%

Optimisation du pharmacophore

 33	900	65%	370	105%
 34	63	105%	3,2	96%
 35	44	103%	1,4	102%
 36	21	107%	0,6	105%
<i>Modification de R5, R6</i>				
				
 37	128	106%	12	100%
 38	156	82%	68	96%



229

93%

44

97%

Tableau 5 : activité biologique des analogues du composé **14**. EC_{50} = concentration efficace à 50%.%_{trans max} = Pourcentage maximal de transactivation.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de cette première série d'analogues.

Tout d'abord, en termes d'activité, on constate que la présence des deux méthoxy en 3 et 4 du cycle de gauche est cruciale pour l'activité. En effet, le retrait de l'un des deux (composés **27** et **28**) ou le remplacement par un atome de chlore (composé **29** et **30**) entraîne une nette perte d'activité par rapport au composé **14**. La perte d'activité observée avec le composé **29** est d'ailleurs un autre point de différenciation avec les composés décrits par Exelixis, qui semblait privilégier le motif 4-chloro-3-méthoxyphényle au 3,4-diméthoxyphényle.

L'atome de fluor en position 4 du cycle phényle du bas a un impact positif sur l'activité (composé **14** vs composé **31**). Cette position ne tolère cependant pas de groupement plus encombrants, qu'il soit électrodonneur ou attracteur (composés **32** et **33**). A l'inverse, les substitutions en ortho et méta sur ce cycle **B** sont bien tolérées, et le composé **36** s'avère même plus actif que le composé **14** sur le récepteur humain. La légère amélioration d'activité obtenue avec le composé **36** nous a amené à l'utiliser comme pharmacophore, comme nous le détaillerons par la suite.

Enfin, la substitution 2,6-difluoro sur le cycle aromatique de droite est nécessaire à l'activité, en particulier pour le récepteur murin. En effet, une comparaison des ratios hEC_{50}/mEC_{50} (h/m) entre les composés **14** ($h/m = 46$), **37** ($h/m = 11$) et **38** ($h/m = 2,3$) montre que le retrait successif des atomes de fluor tend à rééquilibrer les activités, sans perte notable de la puissance sur le récepteur humain. Comme nous souhaitons réaliser une preuve de concept chez la souris, une bonne activité sur le récepteur murin est indispensable. Cependant, savoir rééquilibrer les activités sur les deux récepteurs est important pour renforcer la prédictivité du modèle animal vis-à-vis de l'effet attendu chez l'homme.

4. Seconde série d'analogues

Cette seconde série d'optimisation avait pour but d'obtenir le pharmacophore le plus actif possible, avec si possible un retour à l'équipotence entre le récepteur murin et le récepteur humain. Le premier objectif était d'évaluer l'activité de l'analogue du composé **12** (avec l'azote extracyclique portant un hydrogène et un groupement 3,4-diméthoxybenzyle) en série imidazole, afin de tenter de rétablir l'équipotence entre les deux espèces, et d'explorer l'impact d'un remplacement du méthyle porté par l'azote extracyclique par un hydrogène.

Nous souhaitons également explorer la substitution sur le carbone 4 (R') de l'imidazole (Figure 41).

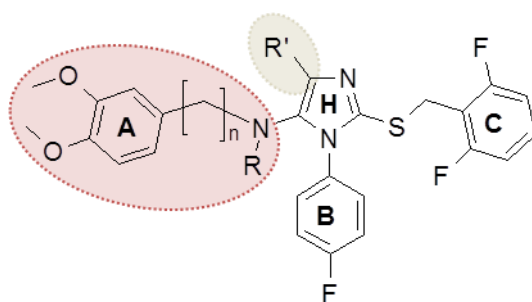


Figure 41 : Positions cibles de la seconde série d'exploration des relations structure activité de la série des 5-amino-2-thioimidazoles.

En gris : Substitution du carbone 4 de l'imidazole.

En rouge : Impact du caractère benzylique ($n=1$) vs phénylique ($n=0$) du cycle A. Rôle du méthyle sur l'azote extracyclique ($R = H$ vs $R = Me$).

a) Synthèse des analogues modifiés autour du cycle A.

A priori, la synthèse des composés modifiés autour du cycle A a été envisagée en suivant la voie de synthèse n°1. Cependant, alors que la cyclisation s'est déroulée comme prévu pour les composés N-méthylés, elle a échoué pour les composés N-H (Figure 42).

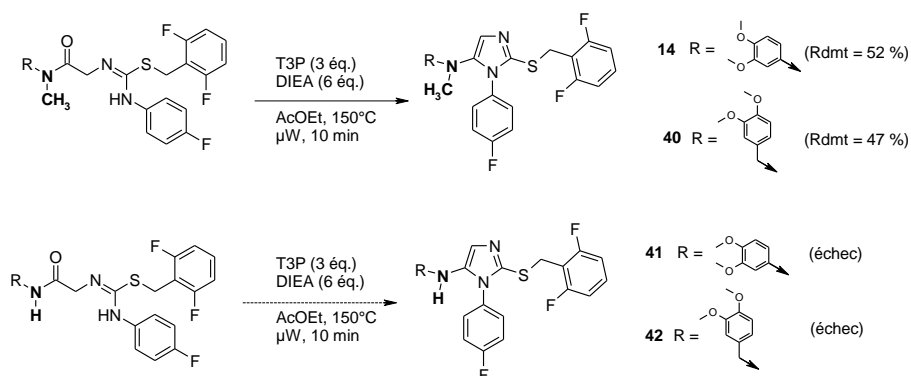


Figure 42 : Tentative de synthèse des composés 40, 41 et 42 par la cyclodéshydratation au T3P®.

En effet, dans le cas du composé **41**, le produit de départ a été consommé, et le produit attendu observé. Cependant, le milieu réactionnel était anormalement complexe, le composé **41** s'est avéré instable dans le milieu et n'a pas pu être isolé. Dans le cas du composé **42**, le milieu réactionnel était complexe également. Deux tentatives de purification ont été réalisées, et il semble que le produit isolé se soit dégradé après purification.

D'autres analyses rétrosynthétiques ont alors été envisagées pour tenter de parvenir aux composés **41** et **42** (Schéma 17).

Optimisation du pharmacophore

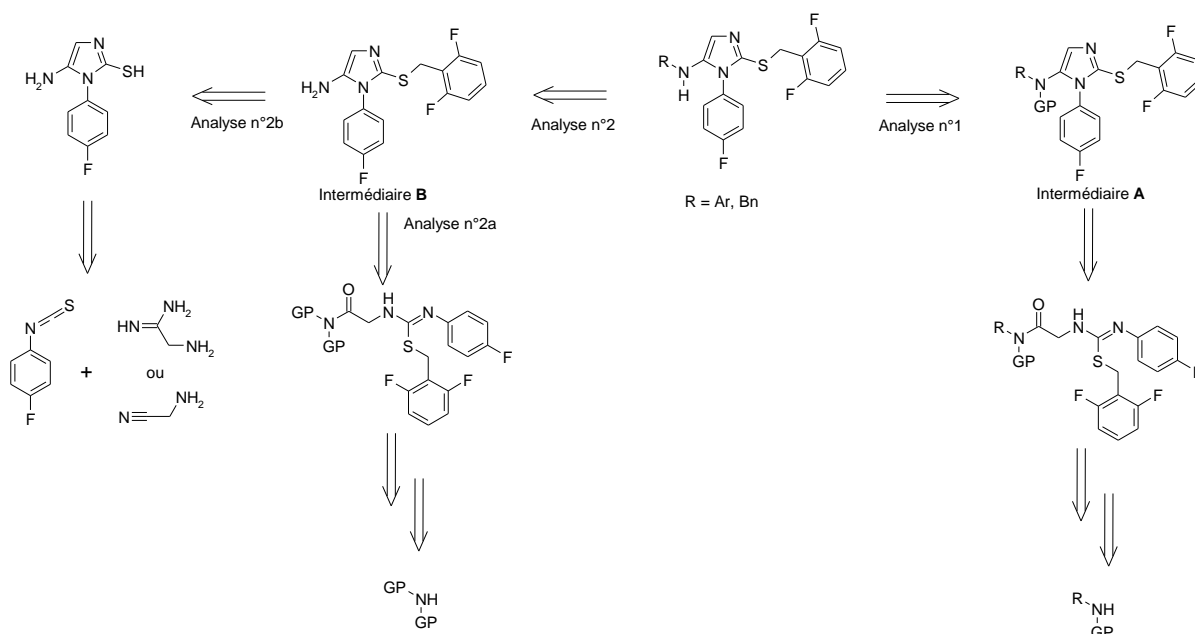


Schéma 17 : Analyses rétrosynthétiques permettant d'aboutir aux composés 41 et 42.

GP = Groupement Protecteur.

L'analyse n°1 consiste à utiliser un groupement protecteur sur l'azote, qui permette la cyclisation. Cette voie n'a pas été envisagée en priorité, car la déconnexion du groupement protecteur se fait nécessairement en fin de rétrosynthèse. En pratique, cela nécessite de réaliser l'ensemble de la synthèse en parallèle pour chacun des composés voulus.

C'est pourquoi l'analyse rétrosynthétique n° 2 nous a paru plus attrayante. En effet, le substituant R de l'atome d'azote est ici déconnecté en début de rétrosynthèse : ainsi, cette voie nécessite la synthèse d'un intermédiaire **B** commun qui est ensuite décoré en dernière étape pour obtenir les composés d'intérêt. De plus, l'expérience des 3-amino-5-thio[1,2,4]triazoles nous a montré que cet azote extracyclique pouvait être alkylé par amination réductrice, ou arylé par couplage de Chan-Lam-Evans. Pour obtenir cet intermédiaire, nous avons tout d'abord envisagé l'analyse rétrosynthétique 2a, qui est une adaptation de la voie de synthèse n°1, avec l'azote extracyclique doublement protégé.

Le groupement protecteur choisi a été le groupement allyle. Ce groupement a été choisi car nous souhaitons un groupement protecteur qui ne modifie pas la réactivité de l'amide au cours de la cyclodéshydratation. C'est pourquoi un groupement de type alkyle nous paraissait plus adapté que des groupements de type carbamate ou imide. Le groupement allyle est de plus bien décrit comme protecteur des amines et anilines primaire et secondaire¹⁰²⁻¹⁰⁴.

La synthèse du composé diallylé **43**, a donc été réalisée selon la voie de synthèse n°1 en partant de la diallylamine commerciale. Le composé **43** a ainsi été obtenu avec un rendement global de 41% sur 5 étapes (Schéma 18).

Optimisation du pharmacophore

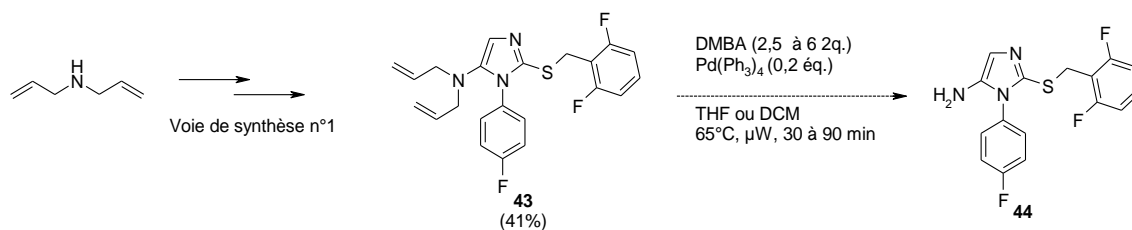


Schéma 18 : Synthèse du composé 43 selon la voie de synthèse n°1 et tentative de déprotection pour obtenir le composé 44.

DMBA = Acide N,N'-diméthylbarbiturique.

Cependant, les tentatives pour déprotéger l'amine primaire ont toutes échouées. Les conditions décrites utilisées menaient principalement à la conversion en produit mono-allylé. Malgré l'optimisation des conditions, en particulier au niveau du soin apporté lors du dégazage du solvant et via le passage du chauffage thermique au chauffage microonde pour obtenir une conversion largement majoritaire en produit voulu, ce dernier n'a jamais pu être isolé. En particulier, il s'est avéré instable pendant le retraitement lors du lavage par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃, et pendant la purification par HPLC-MS préparative.

Nous avons alors décider de suivre l'analyse rétrosynthétique 2b, en adaptant la synthèse décrite pour les 3-amino-5-thio[1,2,4]triazoles⁸⁹ et celle décrite pour les 3-aminopyrazoles¹⁰⁵ aux imidazoles (Schéma 19).

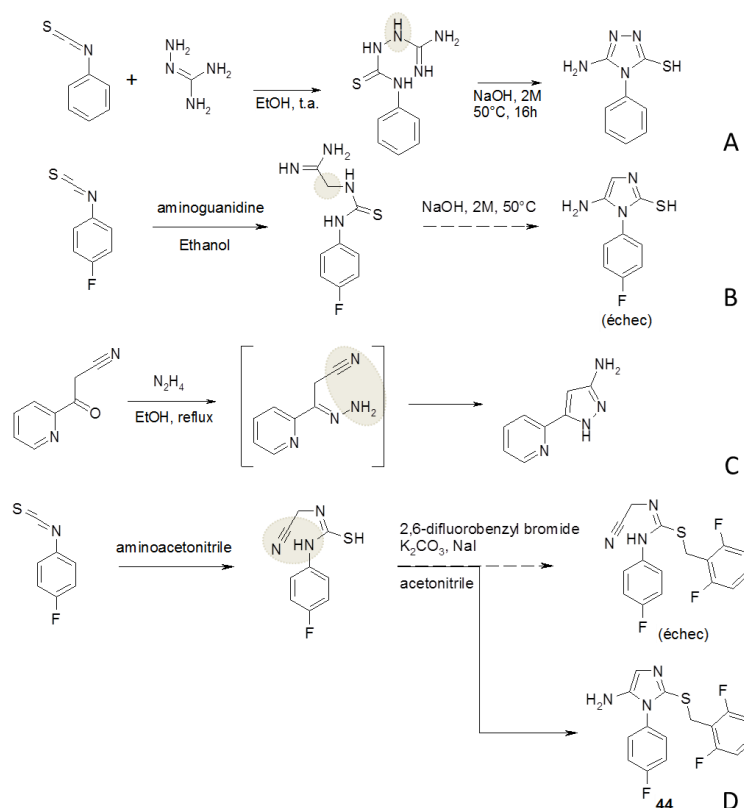


Schéma 19 : Synthèses décrites pour 3-amino-5-thio[1,2,4]triazoles (A) et les 3-aminopyrazoles (C), et tentatives d'application aux 5-amino-2-thioimidazoles (B et D).

La réaction entre le 4-fluorophénylthiocyanate et l'aminoguanidine a permis l'obtention des thiourées voulues. Dans le cas de l'adaptation de la synthèse des aminotriazoles, la cyclisation n'a pas pu être obtenue (Schéma 19 B). De manière intéressante, il s'est avéré que la réaction d'alkylation du soufre par un halogénure de benzyle permettait l'obtention non pas l'isothiourée attendue mais directement l'aminothioimidazole voulu (Schéma 19 D). Les différentes tentatives de purification, par HPLC préparative et par chromatographie flash n'ont malheureusement pas permis d'isoler ce composé. Seule une réaction d'acylation par couplage avec le chlorure de l'acide 3,4-diméthoxybenzoïque sur le résidu non purifié a permis l'obtention du composé **45** pur et stable après purification (Schéma 20). Les réactions d'amination réductrice réalisées en catalyse basique comme précédemment décrit (cf IV.B.2.b)) ont quant à elles échoué.

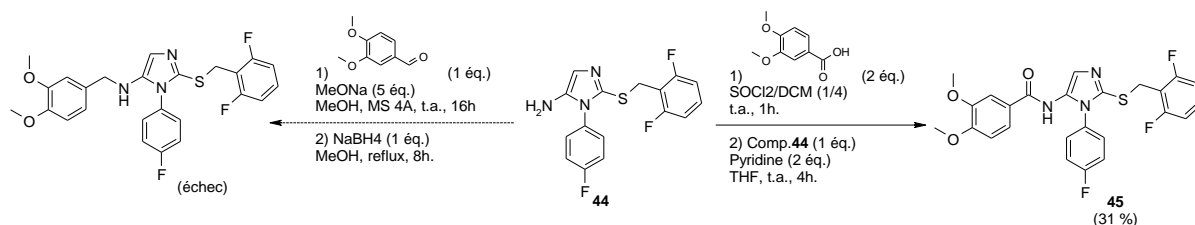


Schéma 20 : acylation et alkylation de l'azote extracyclique du composé **44**.

Nous avons alors été contraints de suivre l'analyse rétrosynthétique n°1. Cependant, afin d'obtenir une voie de synthèse plus convergente, nous avons décidé de déconnecter différemment l'acétamidoisothiourée, précurseur de la cyclisation (Schéma 21).

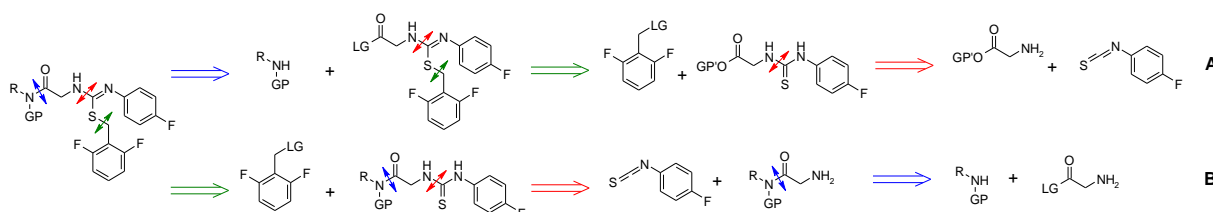


Schéma 21 : Modification de l'analyse rétrosynthétique de l'acétamidoisothiourée. La séquence du haut (analyse n°1bis, A) correspond à la nouvelle analyse envisagée. La séquence du bas (B) correspond à l'analyse ayant conduit à la voie de synthèse n°1.

La synthèse du composé **43** (Schéma 22) a donc été tentée selon l'analyse rétrosynthétique 1bis (Schéma 21, avec R = GP = allyle).

Optimisation du pharmacophore

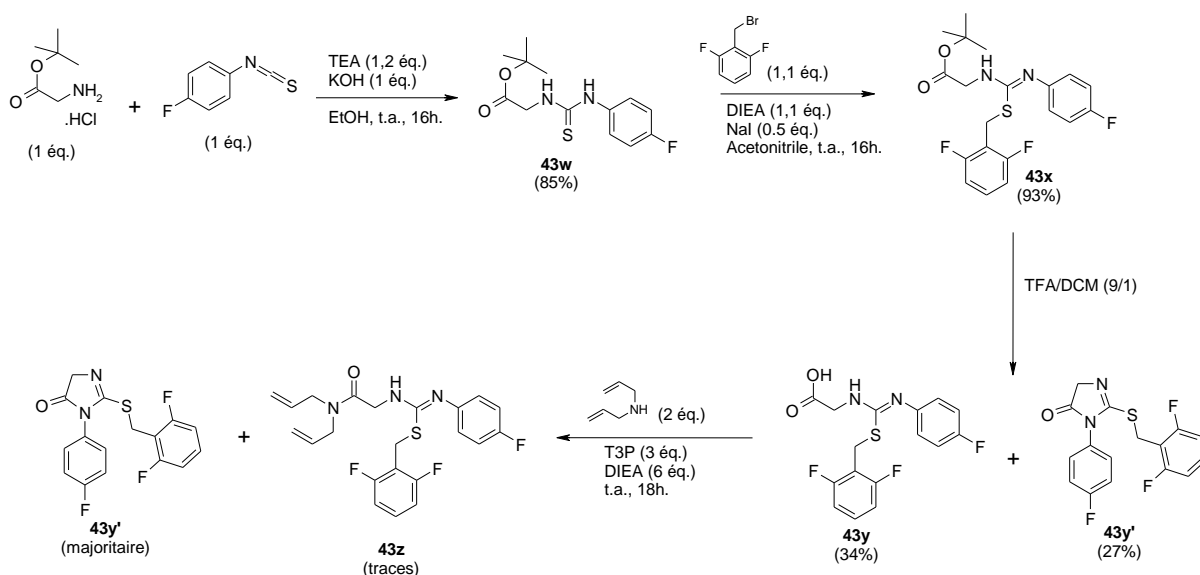


Schéma 22 : Synthèse du composé 43 selon l'analyse rétrosynthétique n°1bis.

- La thiourée **43w** a été obtenu par addition du *tert*-butanolate de glycine, préparé extemporanément à partir du chlorhydrate correspondant, sur le 4-fluorophénylthiocyanate.
- L'atome de soufre a ensuite été alkylé par substitution nucléophile du bromure de 2,6-difluorobenzyle dans l'acétonitrile en milieu basique pour donner l'isothiourée **43x**.
- La déprotection de l'ester tertibutylique en milieu acide (TFA/DCM 9/1) a permis d'obtenir l'acide correspondant **43y**, mais aussi un produit de cyclisation, l'imidazolinone **43y'**.
- Malheureusement, l'activation de l'acide **43y** pour obtenir l'amide désirée (composé **41z**) s'est avérée infructueuse, et a à nouveau donné le composé **43y'**.

Cette voie de synthèse a donc été abandonnée.

Une dernière tentative a été effectuée pour obtenir le composé **41** (analogue N-déméthylé du composé **14**) en suivant l'analyse rétrosynthétique n°1 :

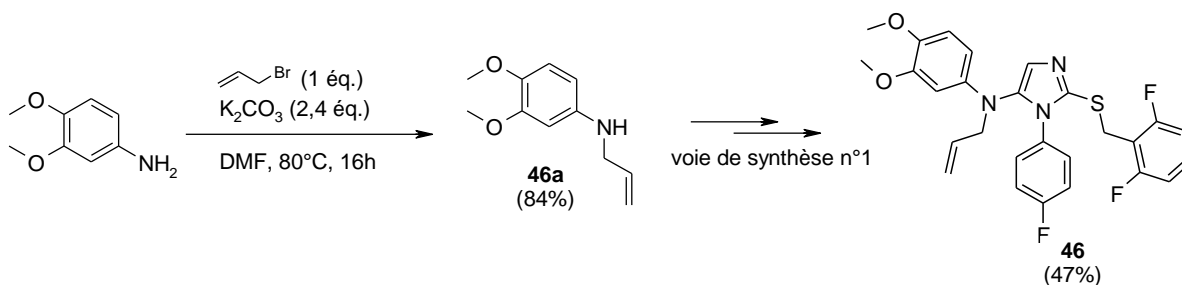


Schéma 23 : Synthèse du composé 44 par la voie de synthèse n°1 à partir de la N-allyl-3,4-diméthoxyaniline.

A partir de la N-allyl-3,4-diméthoxyaniline obtenue par substitution nucléophile du chlorure d'allyle par la 3,4-diméthoxyaniline¹⁰⁶, le composé **46** a été obtenu selon la voie de synthèse n°1, avec un rendement global de 47% (Schéma 23). Après optimisation des conditions de déprotection pour obtenir la meilleure conversion possible tout en conservant le milieu propre, la déprotection a été réalisée, selon les conditions suivantes : acide N,N'-diméthylbarbiturique, palladium tétrakis triphénylphosphine, dans le tétrahydrofurane, en chauffage microondes à 100°C pendant 90 min. Après purification par HPLC-MS préparative, le produit **41** a été obtenu pur. Malheureusement, le produit s'est dégradé lors de la lyophilisation.

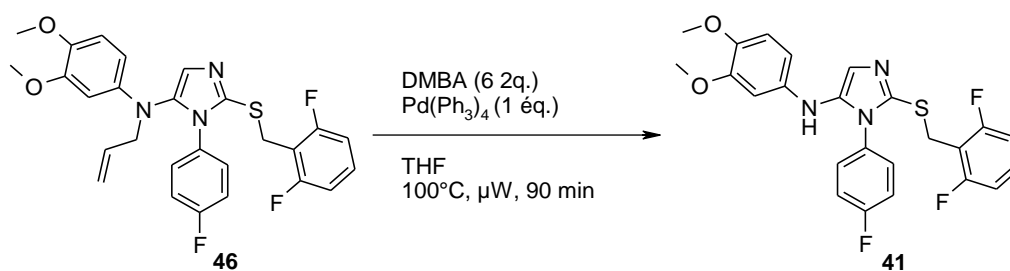


Schéma 24 : tentative de déprotection du composé 46 en composé 41.

Ce nouvel échec nous a amené à abandonner l'objectif d'obtenir ces composés portant un hydrogène sur l'azote extracyclique, au vu de leur instabilité, même une fois isolé.

b) Synthèse des analogues substitués sur le carbone 4 de l'imidazole H.

Un seul composé substitué sur le carbone 4 de l'imidazole par un groupement méthyle a jusqu'ici été synthétisé. Nous souhaitons d'abord évaluer si le site de fixation de TGR5 pouvait tolérer un encombrement en cette position.

Ce composé a été obtenu en suivant la voie de synthèse n°1. La Boc-Gly-OH a ici été remplacée par la Boc-Ala-OH lors de l'obtention du composé **47b**, pour permettre d'introduire le groupement méthyle (Schéma 25).

Optimisation du pharmacophore

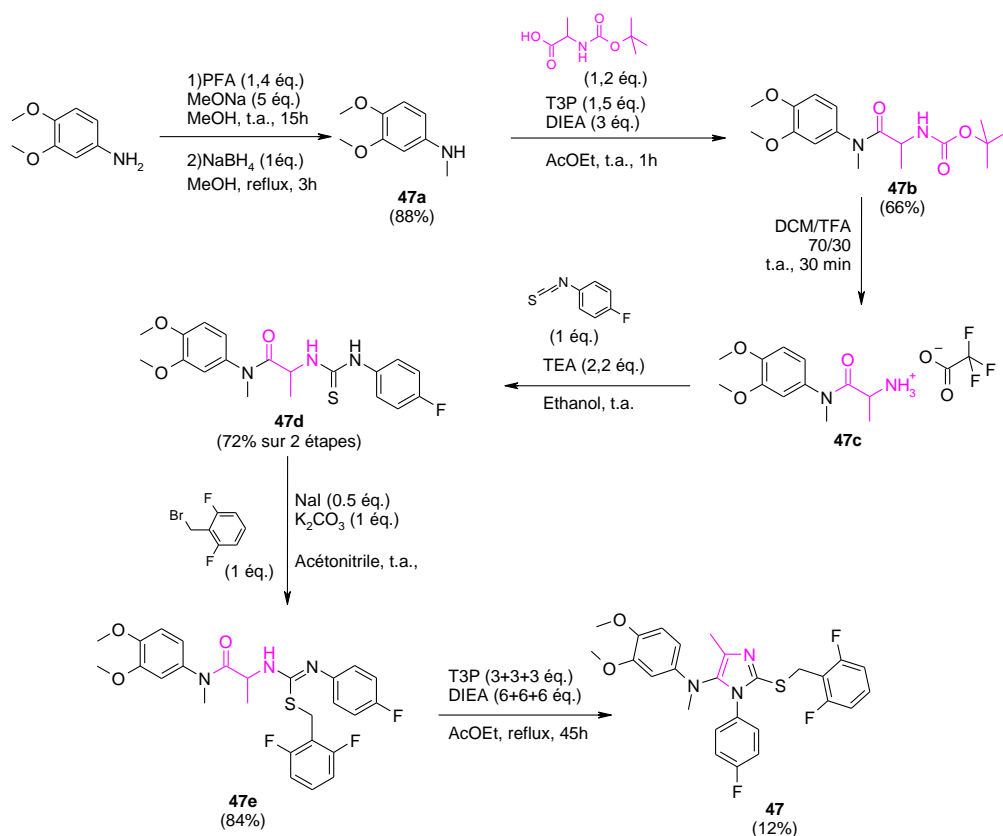
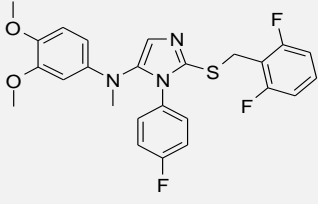


Schéma 25 : Synthèse du composé 47 selon la voie de synthèse n°1.

c) Evaluation de l'activité des composés

L'activité des composés **40**, **43**, **45**, **46**, **47** sur les récepteurs humain et murin a été évaluée sur le test primaire. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

Composé	Récepteur Humain		Récepteur murin	
	EC ₅₀ (nM)	% trans. max	EC ₅₀ (nM)	% trans. max
 14	30	95%	0,8	102%
Modification autour du cycle A				

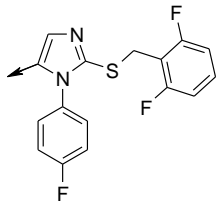
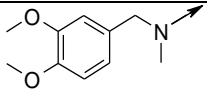
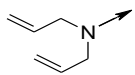
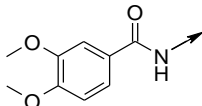
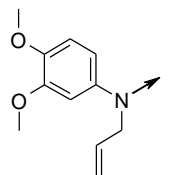
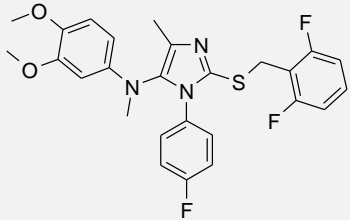
				
 40	325	91%	43	127%
 43	1800	13%	1300	50%
 45	22000	10%	6000	66%
 46	68	83%	<5,1	93%
<i>Modification autour de l'imidazole</i>				
 47	340	86%	7	114%

Tableau 6 : activité biologique de la deuxième série d'analogues du composé 14.

EC₅₀ = concentration efficace à 50%.*%_{trans} max* = Pourcentage maximal de tansactivation.

Concernant les modifications autour du cycle **A**, on constate premièrement que le diallyle (**43**) n'est pas actif. De manière plus informative, le composé acylé (**45**) n'est pas actif non plus. A l'inverse, le composé **40** maintient une activité correcte sur les deux récepteurs, ainsi

que la différence d'activité humain vs murin. Le composé **46** montre quant à lui que des groupements plus encombrants que le méthyle sur l'azote de l'aniline sont très bien tolérés. Cette position pourra faire l'objet de plus amples explorations.

Enfin, la substitution du carbone 4 de l'imidazole (**47**) est tolérée, malgré la légère perte d'activité observée par rapport au composé **14**. Une exploration de cette position est d'ailleurs actuellement en cours au sein du projet.

D. Conclusion sur l'optimisation du pharmacophore

Le développement des deux séries, triazoles et imidazoles, à partir d'une stratégie de remplacement isostérique carbone vers azote inspirée de l'étude de séries issues d'un criblage haut-débit en interne et de séries publiées par la société Exelixis a permis l'amélioration de l'activité par rapport au composé de départ d'un facteur 1000 (composé **1** vs composé **14**). La différence d'activité entre le récepteur humain et murin a pour certains composés été réduite à un facteur 2 (composé **38**). La Figure 43 résume l'ensemble des résultats obtenus sur ces composés.

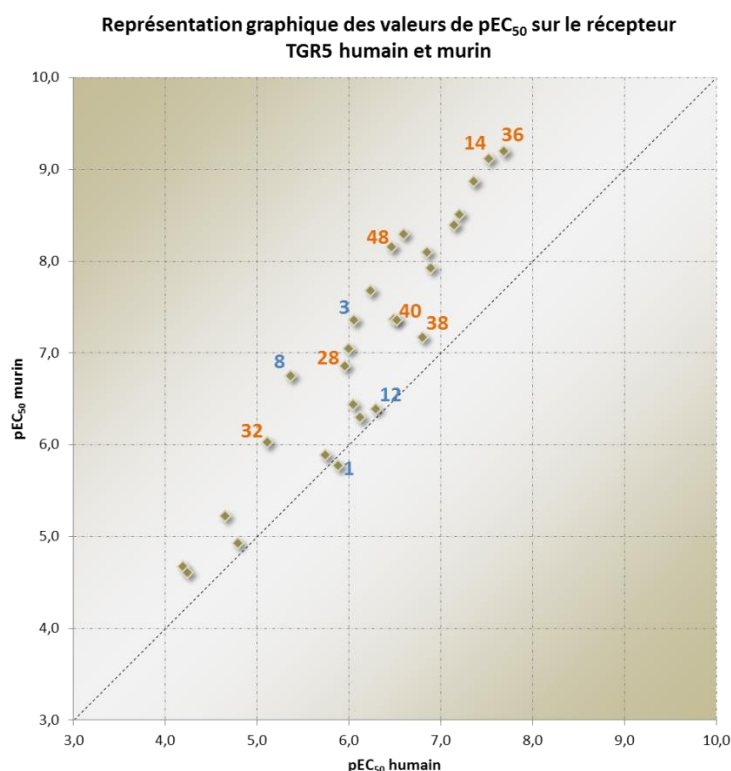


Figure 43 : Représentation graphique de l'activité sur les récepteurs TGR5 humain et murin des composés obtenus lors de l'optimisation du pharmacophore.

$pEC_{50} = -\log(EC_{50})$.

En bleu : composés avec un noyau triazole.

En orange : composés avec un noyau imidazole.

On constate globalement une meilleure activité (pEC_{50} supérieure) sur le récepteur murin que sur le récepteur humain, avec quelques exceptions telles que les composés **12** et **38**. Le passage du triazole à l'imidazole a permis un net gain d'activité (composé **8** vs **14**). Deux composés se détachent du groupe pour leur puissance élevée sur les récepteur humain et murin, et vont être utilisés comme pharmacophore par la suite : les composés **14** et **36**.

Ces résultats représentent une base de réflexion solide pour construire la deuxième étape de ce projet : l'identification d'une position permettant de lier un kinétophore, puis l'optimisation de ce kinétophore. Ces étapes vont maintenant être détaillées.

V. Optimisation du kinétophore

A. Rationnel du choix des groupements kinétophores

Comme évoqué précédemment, la diminution de l'absorption intestinale peut être obtenue en augmentant la taille et/ou la polarité du composé d'intérêt. Dans cet objectif, nous avons choisi d'adopter une stratégie qui consiste à greffer sur nos composés agonistes de TGR5 un groupement kinétophore, qui permettra de diminuer la perméabilité du composé, et donc de diminuer l'exposition systémique tout en favorisant l'exposition du tractus gastro-intestinal, et en particulier de sa partie distale (iléon et côlon) où TGR5 est le plus exprimé. Nous avons donc choisi d'évaluer l'impact de trois types de structures distinctes utilisées comme kinétophores :

- Des structures ioniques, augmentant faiblement la masse moléculaire, mais fortement la polarité. Nous nous sommes plus précisément intéressés aux ammoniums quaternaires, cationiques et aux sulfonates, anioniques (Figure 44). Ces deux groupements présentent entre autre l'avantage d'être ionisés dans toute la gamme de pH de l'organisme.
- Des structures non ioniques, mais fortement hydrophiles, et de masse moléculaire potentiellement très élevée : les éthers méthyliques de polyéthylène glycols (mPEG). Ces structures polymériques constituées d'un enchainement d'unités éthylène glycol (Figure 44) sont intéressantes de par leur capacité à augmenter à la fois la taille de la molécule et sa polarité, mais également par la modularité permise par la variation de longueur possible. En effet, la taille de ces composés peut varier de quelques unités éthylène glycol à plusieurs centaines. De plus, ce sont des structures chimiques fréquemment utilisées *in vivo*, possédant une toxicité faible, voire nulle. L'impact des modifications de longueur sur des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques a pu être étudié au cours de ce projet. Je détaillerai ces résultats par la suite.

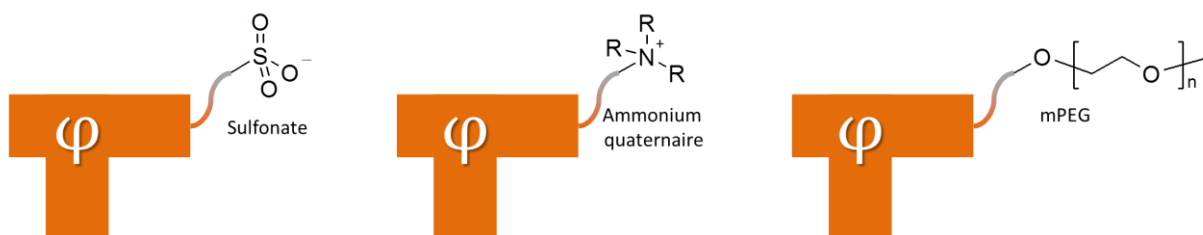


Figure 44 : Structure des kinétophores évalués au sein de ce projet.

R représente un groupement alkyle. n représente le nombre d'unités monomériques.

Outre le kinétophore, la structure chimique qui le relie au pharmacophore, *i.e.* le linker, peut également avoir une importance. En effet, il est envisageable que la structure chimique utilisée comme kinétophore entraîne une perte d'activité en défavorisant la liaison du pharmacophore avec la cible. Un linker plus long, plus rigide, ou orientant différemment le

kinétophore peut alors permettre de retrouver l'activité biologique en maintenant les propriétés pharmacocinétiques procurées par le kinétophore. Dans le travail présenté ici, 4 types de linker ont été envisagés. Initialement, un linker propargyle a été utilisé. Pour des raisons d'efficacité de la voie de synthèse, un linker de type propyloxy a par la suite été utilisé. Pour les composés portant un groupement PEG, nous avons d'abord tenté de greffer directement le kinétophore sur le pharmacophore, puis nous avons tenté l'utilisation d'un groupement hexyn-1-yl pour éloigner le PEG du kinétophore.

Concernant la mise en évidence d'une position pouvant tolérer l'ajout d'un kinétophore, la sensibilité du cycle **A** et la non-tolérance à l'encombrement stérique même faible du cycle **B** semble exclure ces deux positions. Cette conclusion est en accord avec la position des kinétophores choisie dans la série décrite par Exelixis, en para du cycle aromatique **C**.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons choisi de conserver le composé **14** comme pharmacophore, et de synthétiser un composé correspondant au **14** avec un groupement kinétophore branché en para du cycle **C** (Figure 45).

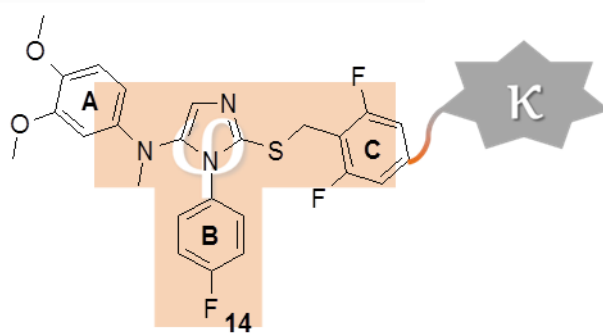


Figure 45 : Structure d'un composé basé sur le 14, portant un kinétophore.

B. Définition de la position portant le kinétophore

1. Synthèse

Le premier groupement kinétophore choisi a été l'ammonium quaternaire. Celui-ci a été introduit en réalisant une réaction de Sonogashira avec la N,N-diméthylpropargylamine sur le composé **48b**, analogue du composé **14** bromé en para du cycle benzylique. L'amine tertiaire obtenue a ensuite été méthylée par substitution nucléophile sur l'iodométhane (Schéma 26). La purification du composé **48** a été réalisée par chromatographie liquide haute performance en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (RP-HPLC/MS) préparative, en utilisant une phase mobile basique tamponnée par le formiate d'ammonium à pH = 9,2. Ceci explique la présence du contre-ion formiate, dont la stœchiométrie a été vérifiée par RMN.

Optimisation du kinétophore

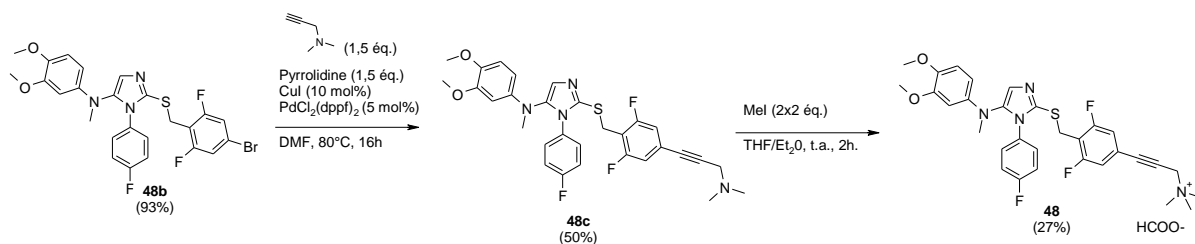


Schéma 26 : Synthèse du composé 48.

Le composé **48b** a lui été obtenu en suivant la voie de synthèse n°1 (Schéma 27). Le dérivé benzylique activé est issu d'une chloration de l'alcool 4-bromo-2,6-difluorobenzyle commercial. De manière intéressante, la chloration a été obtenue en tentant de réaliser une mésylation (Schéma 27).

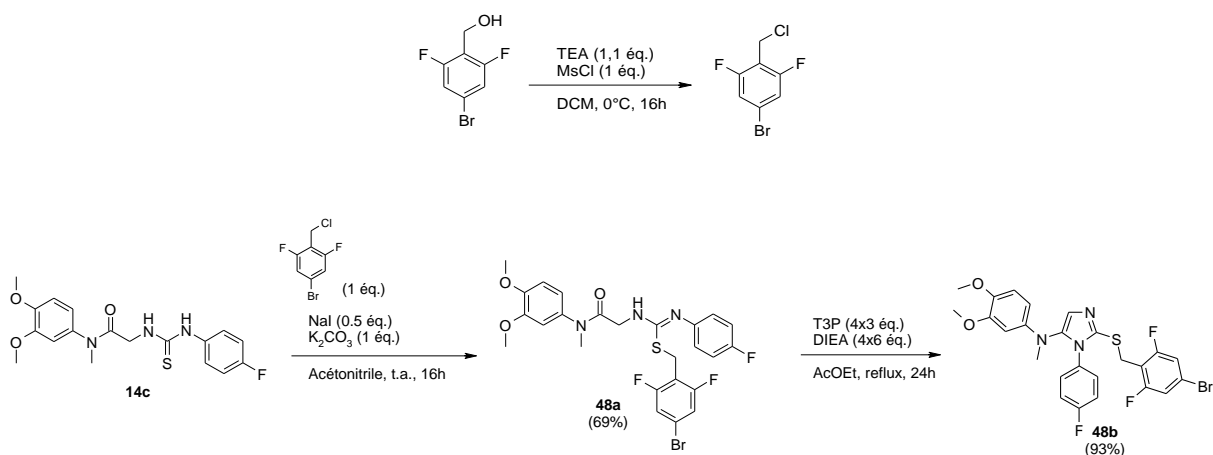


Schéma 27 : Chloration de l'alcool 4-bromo-2,6-difluorobenzyle, et synthèse du composé 48b selon la voie de synthèse n°1.

La présence d'un brome sur le composé **48b** a permis de réaliser avec succès une recristallisation, dans un mélange éthanol/cyclohexane¹⁰⁷. Une cristallographie par diffraction des rayons X a été réalisée par des collaborateurs de l'Unité de Catalyse et de Chimie du Solide (UCCS, CNRS UMR 8181), et le résultat a permis de définitivement confirmer la structure de 5-amino-2-thioimidazole obtenue par la réaction de cyclodéshydratation au T3P® (Figure 46).

Optimisation du kinétopore

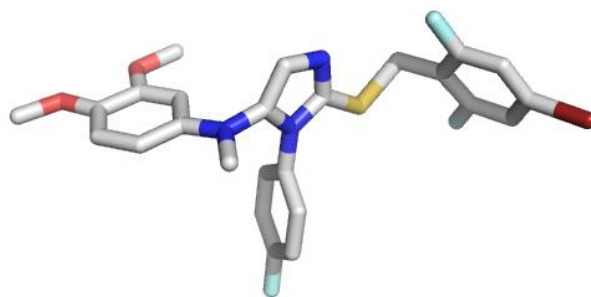


Figure 46 : Structure radiocristallographique du composé 48.

Légende : Gris = carbone. Bleu = azote. Rouge = oxygène. Jaune = soufre. Turquoise = fluor. Bordeaux = brome.

2. Activité biologique

Les composés **48c** et **48** ont tous les deux été testés sur le test primaire, et ont une activité très intéressante (Figure 47), malgré l'ajout du groupement kinétopore.

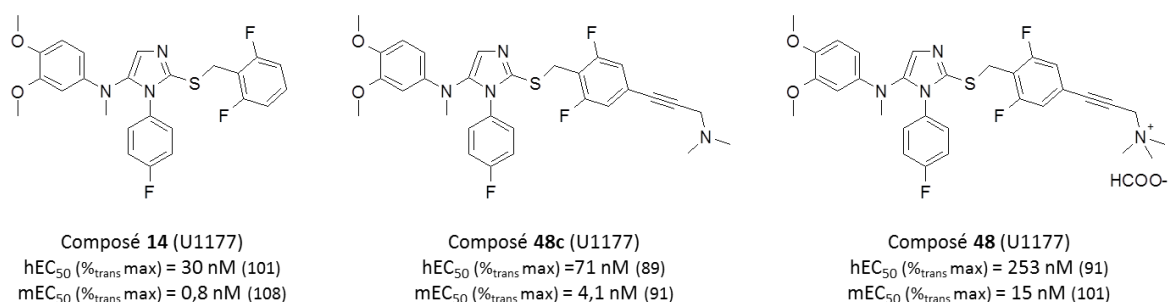


Figure 47 : Structures et activités sur le test primaire des composés 14, 48c et 48.

Le composé **48** validant notre hypothèse de départ, de nouveaux composés dérivés du composé **14** ou du composé **36** portant d'autres kinétophores sur cette position *para* du cycle **C** ont été synthétisés.

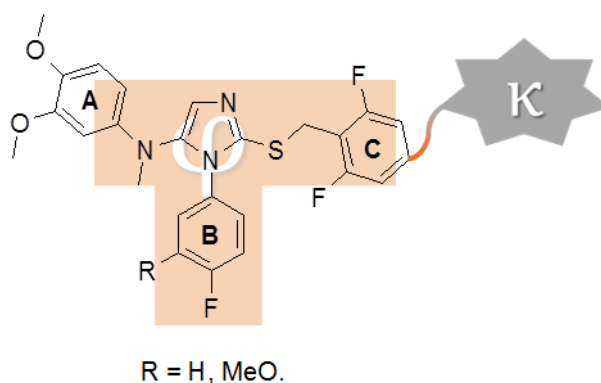


Figure 48 : Structure générale des composés portant un kinétopore, basés sur les composés 14 et 36.

C. Variation du groupement kinétophore

L'ensemble des synthèses qui ont été réalisées pour obtenir des composés portant un kinétophore sont dérivées de la voie de synthèse n°1. Pour cela, le dérivé benzylique utilisé dans la synthèse de l'acétamidoisothiourée **e** à partir de l'acétamidothiourée **d** (Schéma 15 p- 101 -) est au préalable fonctionnalisé, soit pour permettre par la suite l'introduction d'un groupement kinétophore, soit directement par le kinétophore.

1. Composés ioniques

Le composé **49**, portant un ammonium quaternaire (4-aza-1-azonia-bicyclo[2.2.2]octane) comme kinétophore, a été obtenu selon la voie de synthèse suivante (Schéma 28) :

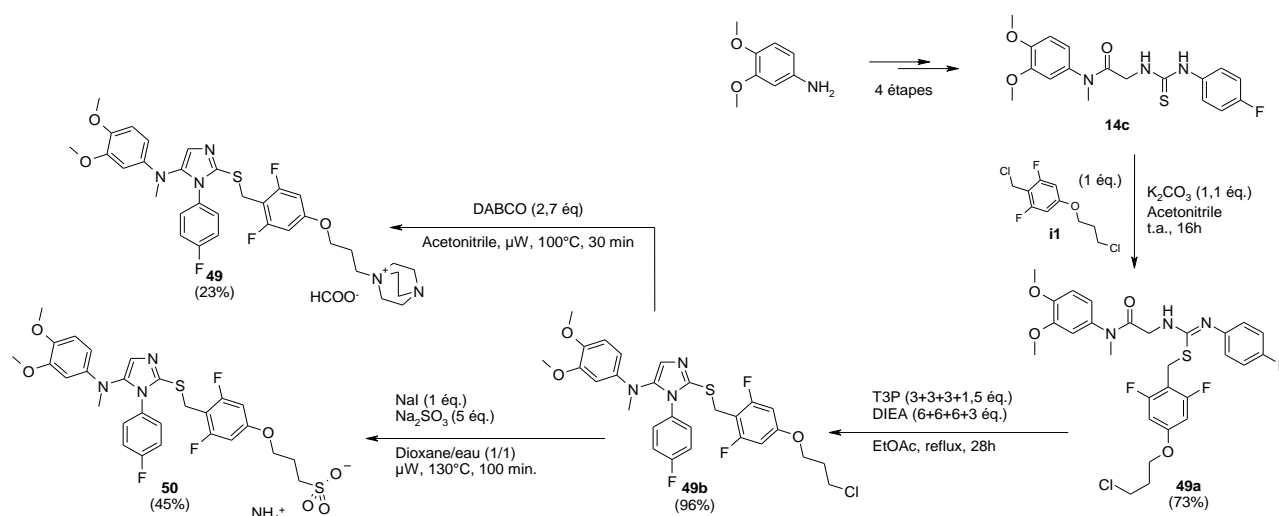


Schéma 28 : Synthèse des composés **49** et **50** selon une voie de synthèse dérivée de la voie de synthèse n°1.

- A partir du composé **14c**, et de l'intermédiaire **i1** (dont la synthèse sera détaillée dans le paragraphe suivant), le composé **49a** a pu être obtenu par la réaction de substitution nucléophile conduisant à l'alkylation sélective de l'atome de soufre de la thiourée.
- Le composé **49a** a ensuite été engagé dans une étape de cyclodéshydratation au T3P®, à reflux de l'acétate d'éthyle, pour donner le composé **49b**.
- Une substitution nucléophile du chloropropyle du composé **49b** par le 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) dans l'acétonitrile à 100°C sous irradiation microonde⁷⁵ a permis d'obtenir le composé **49**.

Le composé **50** a lui été obtenu en une étape à partir du composé **49b**, par sulfonation via l'utilisation du sulfite de sodium dans un mélange dioxane/eau¹⁰⁸. L'iodure de sodium est ici utilisé pour réaliser un échange chlore-iodure sur le chloropropyle afin de faciliter par la suite l'attaque de l'ion sulfite. Cette réaction avait au préalable été tentée en deux étapes, iodation puis sulfonation, mais les rendements cumulés sur les deux étapes étaient inférieurs à 5%. La transposition en une seule réaction one-pot a permis une nette amélioration du rendement, et du temps de manipulation.

L'obtention de l'intermédiaire **i1** quant à elle se déroule en 5 étapes à partir du 2,6-difluoro-4-hydroxybenzonitrile commercial (Schéma 29).

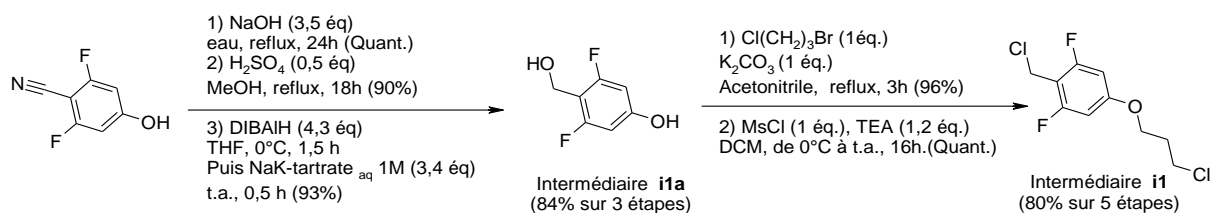


Schéma 29 : Synthèse de l'intermédiaire **i1**.

- Le groupement cyano est ainsi transformé en alcool benzylique par une suite classique de réactions d'aménagement fonctionnel : hydrolyse en milieu basique¹⁰⁹, estérification en catalyse acide¹¹⁰, puis réduction de l'ester en alcool par utilisation de l'hydruire de diisobutylaluminium¹¹¹ (DIBAL-H). L'intermédiaire **i1a** est ainsi obtenu avec un rendement de 84% sur les trois étapes. A noter qu'une tentative de méthanolyse du nitrile en ester méthylique par une réaction de Pinner avait été tentée selon des conditions décrites dans la littérature¹¹¹ (chlorure de thionyle dans le méthanol à température ambiante puis à 50°C) mais s'était avérée complètement inefficace.
- L'intermédiaire **i1a** est ensuite alkylé sur l'oxygène phénolique par substitution nucléophile du brome du 1-bromo-3-chloropropane dans l'acétonitrile à reflux, puis la chloration de l'alcool benzylique précédemment décrite est réalisée pour obtenir l'intermédiaire **i1**.

2. Composés PEGylés

a) Spécificité analytique des composés PEGylés

Les composés mPEGylés, dont la formule générale est présentée dans la Figure 49 sont obtenus via l'utilisation de réactifs commerciaux disponibles dans différentes gammes de longueur de chaîne. Au cours du projet présenté ici, des mPEG dont la masse molaire moyenne varie de 500 à 2 000 g/mol ont été utilisés. Cette taille correspond à une gamme de longueur allant de 7 à 55 unités monomériques. Cependant, dans cette gamme de longueur, les réactifs commerciaux disponibles sont en réalité des mélanges polydisperses centrés sur une longueur de chaîne moyenne. Ceci implique que les composés obtenus à partir de ces réactifs seront en fait des mélanges variant par la taille de la longueur de la chaîne mPEG, dans une gamme de longueur donnée.

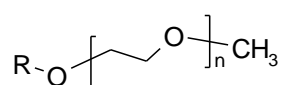


Figure 49 : Formule générale des dérivés mPEGylés.

Une analyse de la distribution des différentes longueurs dans le mélange est donc nécessaire pour caractériser les produits.

J'ai réalisé cette analyse en utilisant la spectrométrie de masse. L'analyse en spectrométrie de masse nous permet en effet de définir les longueurs présentes dans le mélange, mais également leur intensité relative. Pour cela, suite à l'analyse en LC-MS (source en électrospray et analyseur quadrupole), le chromatogramme en spectrométrie de masse du produit pur est généré, et une intégration du pic correspondant à chaque longueur dans chacun de ses états d'ionisation est réalisée. L'aire sous la courbe ainsi obtenue est considérée comme proportionnelle à la quantité relative de la longueur de chaîne considérée, ce qui permet de caractériser le mélange (Figure 50).

La gamme de longueur peut ainsi être définie pour chaque mélange et une masse molaire moyenne est calculée, appelée masse molaire moyenne en nombre : $\overline{M}_n = \frac{\sum_i N_i \times M_i}{\sum_i N_i}$ (où N_i est la proportion relative d'un élément de masse molaire M_i).

A partir de \overline{M}_n est calculé un nombre moyen d'unités monomériques \bar{n} . Ce calcul prend en compte la masse moléculaire du groupement R portant la chaîne mPEG (Figure 49) : $\bar{n} = \frac{\overline{M}_n - M_R - M_{CH_3}}{44}$ (où M_R est la masse moléculaire du radical R, M_{CH_3} est la masse moléculaire du radical méthyle, et 44 est la masse moléculaire d'une unité éthylène glycol – CH₂CH₂O-). C'est ce nombre moyen qui sera indiqué sur les schémas synthétiques à venir.

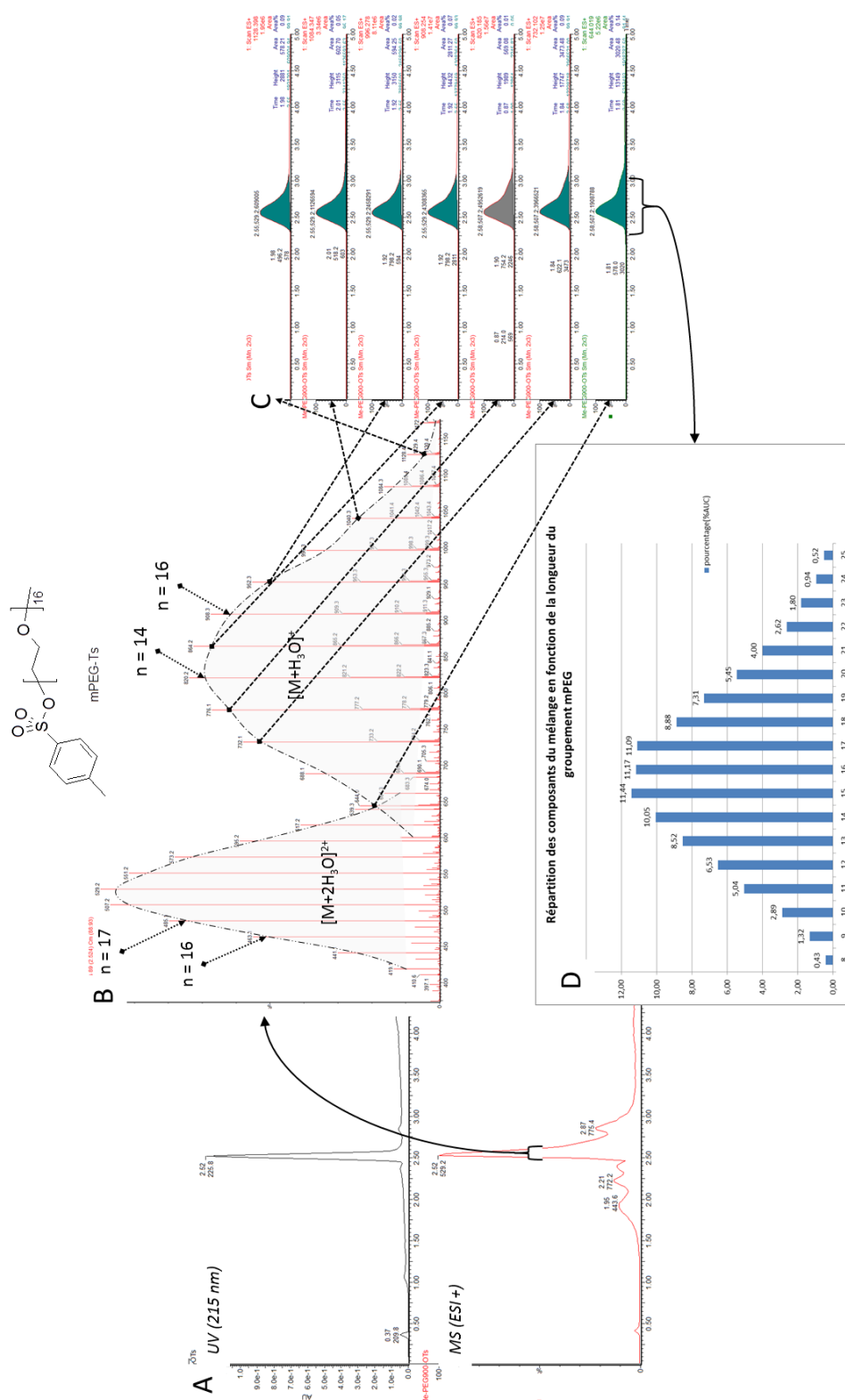


Figure 50 : Exemple de l'analyse de la répartition des longueurs au sein d'un composé mPEGylé (le mPEG-Ts, $n_{\text{moyen}} = 16$) n : nombre d'unités monomériques.

A : Chromatogramme en UV (215 nm) et en MS (ESI+) dont est tiré le spectrogramme de masse.

B : Spectrogramme de masse permettant de déterminer les longueurs de mPEG présentes dans le mélange et les états d'ionisation.

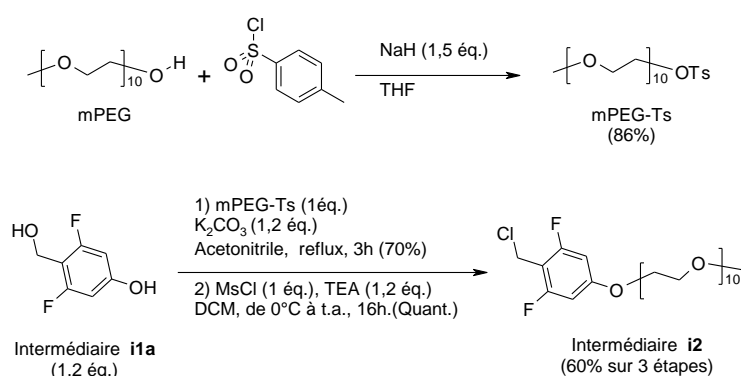
C : Chromatogramme en MS. Chaque ligne correspond à un état d'ionisation d'une des longueurs.

D : Histogramme représentant l'intensité relative de chacune des longueurs. Cet histogramme est obtenu à partir des aires sous la courbe des chromatogrammes obtenus pour chacune des longueurs à chacun de leurs états d'ionisation.

b) Voies de synthèse

Comme je le détaillerai par la suite, l'utilisation du linker propyloxy a permis de maintenir l'activité agoniste TGR5 pour les composés **49** et **50** par rapport au composé **14**. Nous avons alors envisagé d'étudier le groupement mPEG en tant que kinétophore et de le brancher directement sur le cycle aromatique **C**, en considérant la première unité éthylène glycol comme linker. Ce changement avait surtout pour but de simplifier la synthèse.

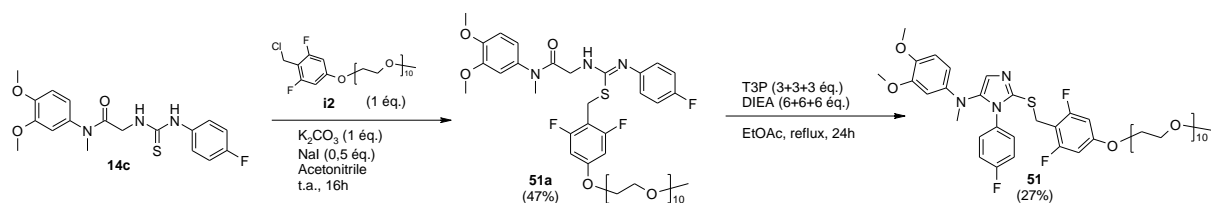
La synthèse des composés PEGylés a tout d'abord été envisagée en modifiant la synthèse des composés ioniques par un remplacement du groupement chloropropyle par le groupement mPEG de longueur voulue sur le cycle benzylique **C** (Schéma 30).



Ts = tosyl.

Il est intéressant de noter que la présence du groupement mPEG sur le composé **i2** a permis de l'analyser par LC-MS et de confirmer la présence du chlore grâce au spectre de masse obtenu, ce qui valide l'hypothèse émise précédemment de la formation du chlorure de benzyle au cours de cette réaction.

L'intermédiaire **i2** a ensuite été utilisé pour obtenir le composé **51** selon la voie de synthèse n°1 (Schéma 31).



Pour ces longueurs de chaîne relativement courte, la purification pouvait être réalisée soit par chromatographie liquide en phase normale (dite chromatographie flash) ou par RP-

HPLC/MS. Nous verrons plus tard que la purification des composés mPEGylés portant des longueurs plus importante a préférentiellement été réalisée en RP-HPLC/MS, car la chromatographie flash donnait des résolutions beaucoup plus faibles.

Dans l'optique d'obtenir aisément des composés portant des groupements PEG de longueur variée, nous souhaitons adapter la voie de synthèse n°1 pour permettre l'introduction du groupement mPEG en dernière étape. Nous avons donc décidé de synthétiser l'intermédiaire **i3**, afin de pouvoir par la suite alkyler le phénol par un groupement mPEG via une substitution nucléophile (Schéma 32).

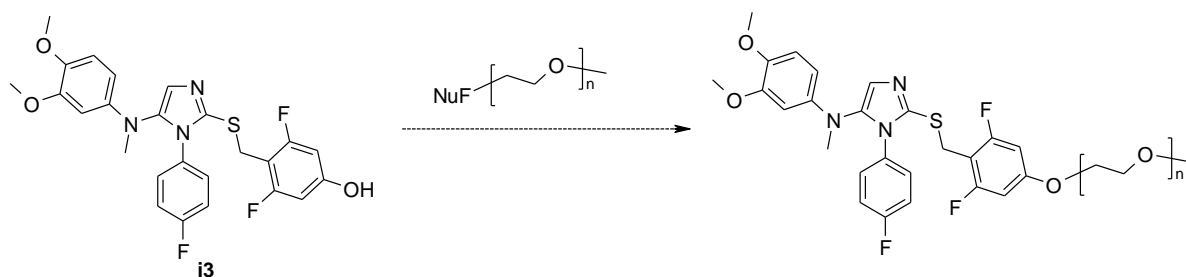


Schéma 32 : synthèse envisagée pour l'obtention des composés porteurs d'un groupement mPEG de longueur de chaîne n à partir de l'intermédiaire **i3**.

NuF = nucléofuge.

Le phénol libre étant incompatible avec l'étape de benzylolation de l'acétamidothiourée **d**, il est nécessaire de réaliser une protection de cette fonction, puis de la retirer après avoir réalisé l'étape de cyclodéshydratation permettant l'accès au 5-amino-2-thioimidazole.

Deux protections chimiques ont été utilisées : le groupement acétyle et le groupement 4-toluènesulfonyle (tosyle).

➤ Groupement acétyle.

Le groupement acétyle a été introduit sur l'intermédiaire **i1a** via une méthode utilisant le chlorure d'acétyle, permettant l'acétylation du phénol et la chloration de l'alcool benzylique en une seule étape¹¹² pour donner l'intermédiaire **i4** (Schéma 33).

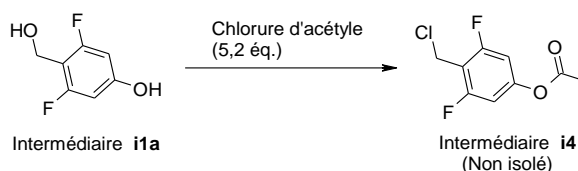


Schéma 33 : obtention de l'intermédiaire **i3** en une étape à partir de l'intermédiaire **i1a**.

Le composé obtenu a alors été directement engagé dans l'étape de benzylation de l'acétamidothiourée **14c** pour donner le composé **i3a**, qui a été cyclisé en 5-amino-2-thioimidazole via l'utilisation de la méthode au T3P®, en chauffage à reflux (Schéma 34).

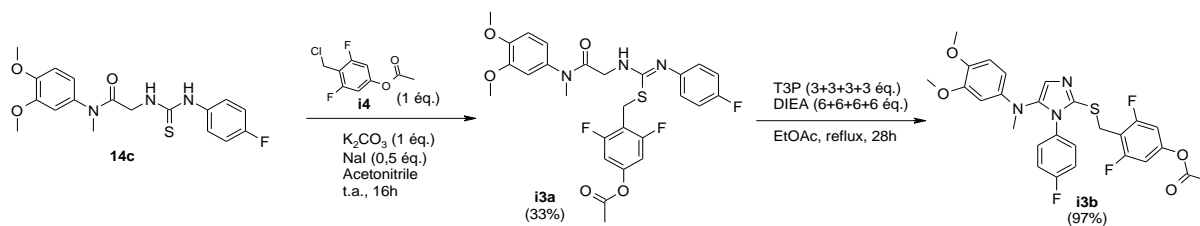


Schéma 34 : Obtention de l'intermédiaire i3b selon la voie de synthèse n°1 à partir du composé 14c et de l'intermédiaire i3.

L'obtention des composés PEGylés désirés impliquait ensuite une réaction d'hydrolyse du groupement acétyle en milieu basique, suivie d'alkylation du phénol par substitution nucléophile. Cependant, cette séquence de réactions n'a pas permis d'obtenir le composé voulu **52**, mais un isomère de position, le composé **52'** (Schéma 35).

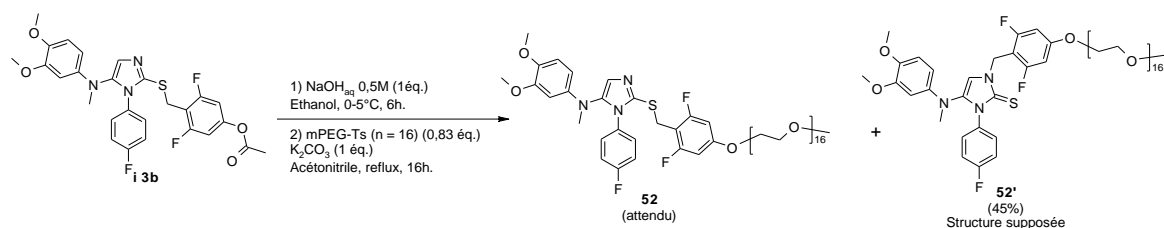


Schéma 35 : Obtention du composé 52' à partir du composé i4b.

L'identité du produit de cette réaction a pu être révélée par analyse RMN 1D et 2D du proton et du carbone 13, en comparant avec les spectres obtenus pour le composé **51** (Figure 51).

Optimisation du kinétophore

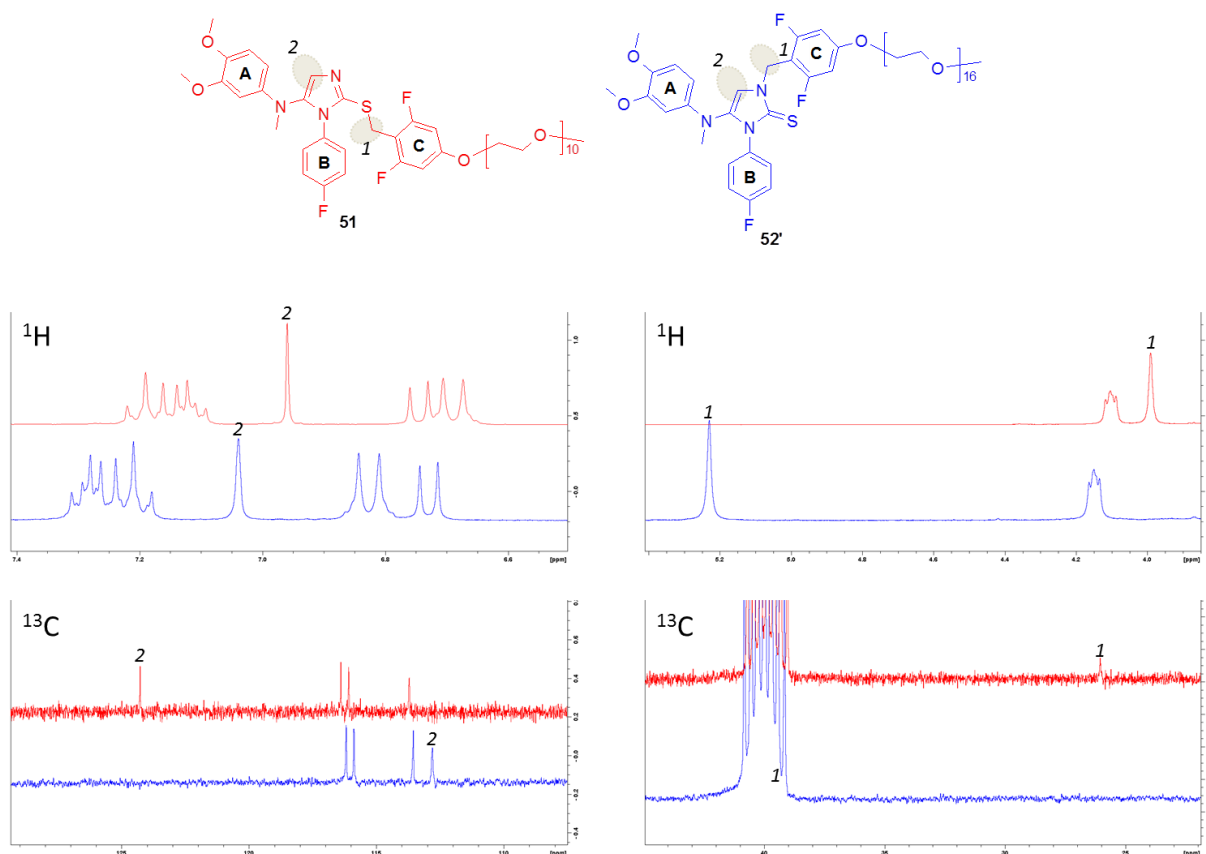


Figure 51 : Comparaison de l'analyse RMN du composé **51** (en rouge) et du composé **52'** (en bleu). Mise en évidence en particulier de la différence de déplacement chimique entre les protons et carbones des positions benzylique sur le cycle **C** (1) et en C4 de l'imidazole (2).

En effet, les composés **51** et **52** sont identiques à la longueur de la chaîne mPEG près. Cependant, le déplacement chimique des carbones et protons en position benzylique du cycle **C** (1 sur la figure) et en position 4 de l'imidazole (2 sur la figure) diffèrent, parfois même fortement, entre le composés **51** et le supposé composé **52'** (Figure 51). Ces différences sont d'autant plus notables que les déplacements chimiques de ces carbones et protons, caractéristiques de la série des 5-amino-2-thioimidazoles, sont habituellement conservés malgré les variations de structure réalisées. En particulier, le déplacement chimique du carbone benzylique du cycle **C** porté par le soufre (1 sur la figure) se situe toujours autour de 20 à 25 ppm, et les protons portés par ce carbone autour de 4,0 à 4,2 ppm.

Bien que nous n'ayons pas de certitude sur la structure du composé **52'**, la détection en HMBC d'un couplage longue distance (J3) entre les protons portés par le carbone benzylique sur le cycle **C** et le carbone 4 de l'imidazole est une donnée clé dans l'établissement de cette structure. Ce couplage confirme en plus la différence de position du cycle **C** entre les composés **51** et **52'**, puisqu'il n'est pas observable dans le cas du **51**, les deux positions étant trop éloignées.

Nous avons fait l'hypothèse qu'en milieu basique, que ce soit pendant la déprotection de l'acétyle ou l'alkylation de l'oxygène du phénol, la charge négative du phénolate de l'intermédiaire **i3** pouvait se délocaliser et favoriser le départ du groupement benzyle (Schéma 36), expliquant pourquoi cette isomérisation n'avait pas été observée auparavant pour les composés alkylés sur l'oxygène phénolique.

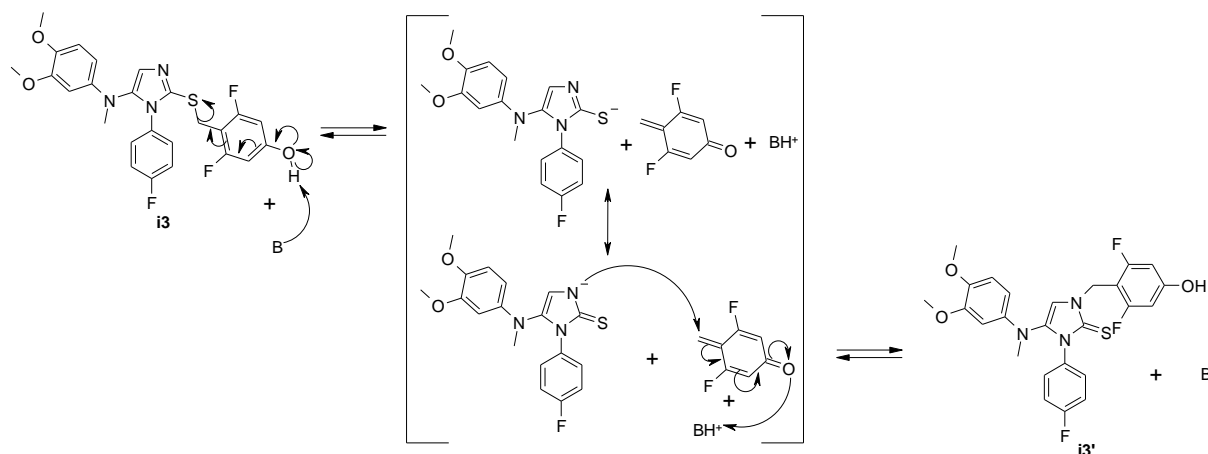


Schéma 36 : Mécanisme proposé pour expliquer l'isomérisation observée lors de l'obtention du composé **i3** en milieu basique.

➤ Groupement 4-toluènesulfonyle.

A la différence du groupement acétyle, le groupement tosyle peut être retiré en conditions neutres, en utilisant par exemple le fluorure de tétrabutyle ammonium¹¹³⁻¹¹⁵. Nous avons donc choisi cette solution pour évaluer si le réarrangement observé lors de la synthèse du composé **52'** était dû à la déprotonation du phénol, ou s'il se produisait même à pH neutre.

L'intermédiaire **i1a** a ainsi pu être ditosylé sur l'alcool benzylique et sur le phénol par réaction avec le chlorure de tosyle en utilisant l'hydruure de sodium comme base (Schéma 37) pour obtenir l'intermédiaire **i5**. L'utilisation d'une base organique plus faible, telle que la diisopropyléthylamine n'avait permis d'obtenir que le composé tosylé sur l'oxygène phénolique.

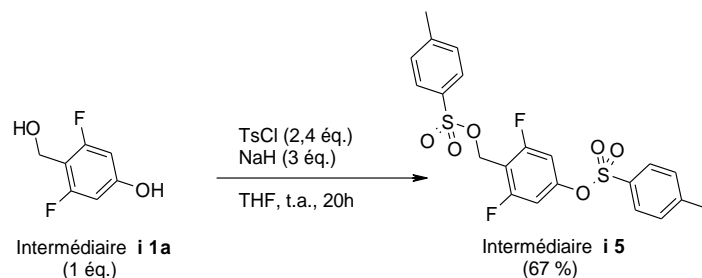


Schéma 37 : Synthèse de l'intermédiaire **i5** par ditosylation de l'intermédiaire **i1a**.

L'intermédiaire **i5** a ensuite été engagé dans l'étape de benzoylation de l'acétamidothiourée **14c** pour donner le composé **i3c**, qui a été cyclisé en 5-amino-2-thioimidazole **i3d** via l'utilisation de la méthode au T3P®, en chauffage à reflux (Schéma 38).

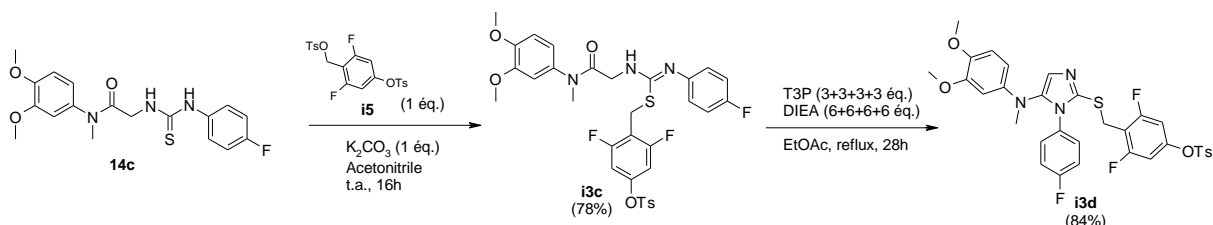


Schéma 38 : Synthèse du composé **i3d** selon la voie de synthèse n°1 à partir des composés **14c** et **i5**.

Plusieurs tentatives de déprotection du groupement tosylé par le TBAF ont ensuite été entreprises. L'utilisation du N,N-diméthylformamide (DMF) comme solvant¹¹⁵ a permis d'obtenir une conversion totale de l'intermédiaire **i3d**. Cependant, une analyse par RMN du résidu de retraitement a montré que le composé obtenu n'était pas l'intermédiaire **i3**, mais à nouveau son isomère **i3'** (Schéma 39).

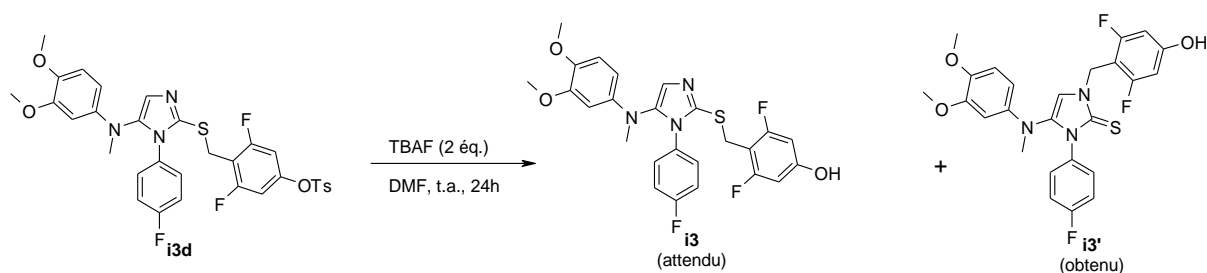
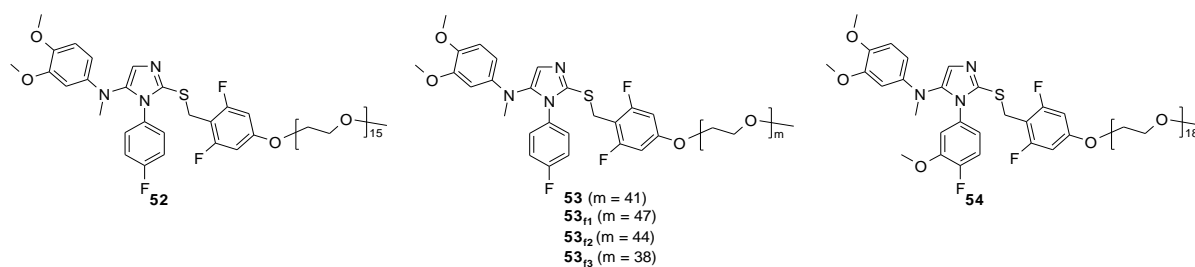


Schéma 39 : Tentative de déprotection du groupement Tosyle par le TBAF et produits obtenus.

N'ayant pas réussi à isoler le composé **i3**, en milieu basique ou neutre, cette stratégie de synthèse a été abandonnée, et les autres composés PEGylés ont par la suite tous été obtenus selon la voie de synthèse utilisée pour le composé **51** (Schéma 31) en faisant varier la longueur de la chaîne PEG sur l'intermédiaire **i2** (Schéma 30).

Ainsi, les composés **52**, **53** et **54** ont pu être obtenus (Figure 52). Lors de la purification par RP-HPLC/MS préparative du composé **53**, les 3 fractions collectées (**53_{f1}**, **53_{f2}** et **53_{f3}**) ont été isolées séparément, puis échantillonnées afin de pouvoir les évaluer une par une, et enfin combinées pour être évaluées comme un tout. Nous avons donc pu observer l'effet de la modification de la longueur du mPEG sur les différentes propriétés physicochimiques, pharmacologiques et pharmacocinétique de ces composés (en comparant les composés **51**, **52**, **53**, **53_{f1}**, **53_{f2}** et **53_{f3}**). La comparaison des composés **52** et **54** a également permis d'évaluer si les effets de modification du pharmacophore étaient maintenus en présence d'un kinétophore.

Figure 52 : Structure des composés 52, 53, 53_{f1}, 53_{f2} et 53_{f3} et 54.

D. Evaluation des composés à visée topique intestinale.

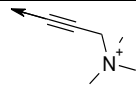
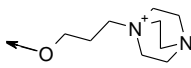
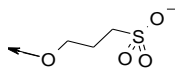
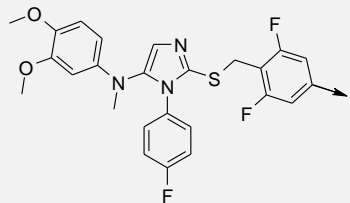
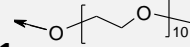
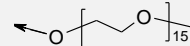
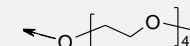
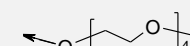
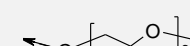
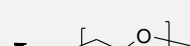
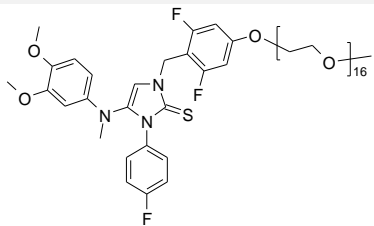
Les composés portant un kinétophore ont été évalués *in vitro* pour leur activité sur les récepteurs TGR5 humain et murin, mais aussi pour leurs propriétés physicochimiques telles que la solubilité ou le coefficient de partage (log D) et pour leur propriétés pharmacocinétiques telles que la stabilité en milieu gastriques et intestinaux simulés, la stabilité microsomale et la perméabilité membranaire. Ces données ont été comparées à celles du pharmacophore nu (composé **14**) pour pouvoir en déduire le rôle du kinétophore dans les variations observées.

1. Activité sur le récepteur TGR5

L'activité des composés **37**, **49**, **50**, **51**, **52**, **52'**, **53** et **54** sur les récepteurs TGR5 humain et murin est présentée dans le tableau ci-dessous (Tableau 7).

Composé	Récepteur Humain		Récepteur murin	
	EC ₅₀ (nM)	% trans. Max	EC ₅₀ (nM)	% trans. max
 14	30	95%	0,8	102%
Ajout d'un kinétophore ionique				

Optimisation du kinétophore

 48	253	93%	15	101%
 49	240	90%	9,8	97%
 50	40	117%	0,5	105%
Ajout d'un kinétophore non ionique				
				
 51	140	109%	8,1	111%
 52	580	60%	29	85%
 53_{f1}	1300	74%	110	129%
 53_{f2}	980	79%	86	139%
 53_{f3}	800	86%	53	131%
 53	1200	71%	68	126%
	N.C.	<15%	2600	82%

Optimisation du kinétophore

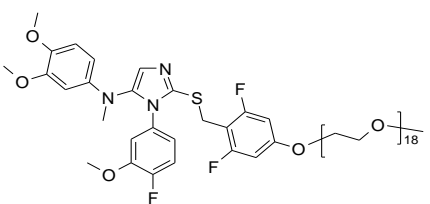
<p>52'</p>  <p>54</p>	330	103%	26	108%
--	-----	------	----	------

Tableau 7 : Activités des composés portant un kinétophore.

EC_{50} = concentration efficace à 50%.

%_{trans} max = Pourcentage maximal de transactivation.

N.C. = non calculé.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces résultats.

Premièrement, les groupements kinétophores sont en général bien tolérés dans cette position. En effet, à l'exception des composés mPEGylés de longueur élevée, l'activité sur les récepteurs humain et murin a été maintenue, avec une légère perte selon les types de kinétophore.

Deuxièmement, les kinétophores ne sont pas tous aussi bien tolérés, même dans une position similaire : alors que le composé **50** portant un sulfonate est autant actif que le pharmacophore nu (**14**), l'équivalent ammonium quaternaire **49** accuse lui une perte d'un facteur légèrement inférieur à 10. Le composé **48** qui porte lui aussi un ammonium quaternaire est légèrement moins actif que le composé **49**. La rigidité du linker propargyle par rapport au linker chloropropyle pourrait être à l'origine de cette légère différence en activité.

Il est important de noter que pour tous les composés, la différence d'activité humain vs murin a été maintenue. De plus, le composé **52'**, isomère du composé **52** s'est avéré totalement inactif.

Concernant les composés mPEGylés, l' EC_{50} apparaît clairement inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne. Une hypothèse pour expliquer cet effet est que l'encombrement stérique généré par la présence de la chaîne mPEG, de plus en plus important quand la taille de la chaîne augmente, peut perturber l'interaction entre le pharmacophore et le récepteur. Comme nous nous attendons à observer une moins bonne perméabilité pour les composés portant un mPEG de longueur importante, qui sont malheureusement bien moins actifs que leur analogues courts, nous avons envisagé l'ajout d'un linker plus long et plus rigide pour éloigner le groupement mPEG du kinétophore, tel qu'un groupement hexyn-1-yl, phényle ou phényléthynyle (Figure 53)

Optimisation du kinétophore

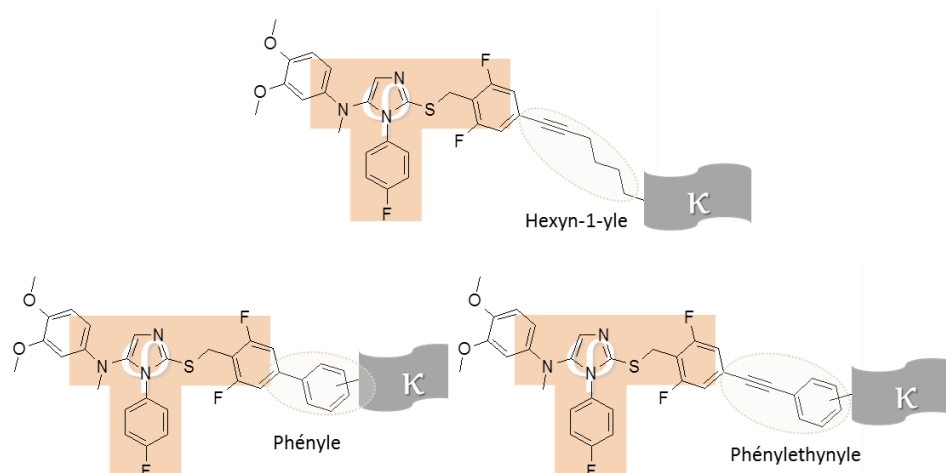


Figure 53 : linkers envisagés pour éloignés le mPEG du pharmacophore.

La synthèse d'un composé portant le groupement hexyn-1-yl a été tentée, mais n'a pas abouti. Par ailleurs, des composés portant le groupement phényle comme linker ont été obtenus récemment au laboratoire, et se sont montrés plus actifs que leurs analogues branchés directement, ce qui tend à confirmer le problème de gêne stérique induite par le groupement mPEG.

Enfin, le changement de pharmacophore entre les composés **52** et **54** s'est accompagné d'une légère augmentation de l'activité, en particulier sur le récepteur humain, ce qui était attendu, au vu de la légère différence d'activité entre les pharmacophores non substitués correspondants (composés **14** et **36**). Cette donnée montre que le kinétophore, bien qu'ayant un impact sur l'activité pharmacologique, n'est pas la structure déterminante de cette activité, et que les modifications apportées au pharmacophore ont un impact même sur un composé portant le kinétophore, à la bonne position évidemment. Il est donc possible de continuer d'optimiser en parallèle pharmacophore et kinétophore.

2. Activité GLP-1 sécrétagogue *in vitro*

Au cours de ce projet, nos collaborateurs biologistes de l'unité Inserm U1011 « Récepteurs nucléaires, Maladies Cardiovasculaires et Diabète » ont également développé un test *in vitro* de sécrétion de GLP-1 utilisant des lignées de cellules entéroendocrines L intestinales. Plusieurs lignées cellulaires sont utilisables pour ce test : les lignées murines GLUTag et STC-1, et la lignée humaine NCI-H716². Dans notre cas, les cellules SCT-1 ont été utilisées. Après incubation avec les composés **48**, **51** ou le composé **3**, la concentration extracellulaire en GLP-1 a été mesurée par un test ELISA. Les deux composés portant un kinétophore sont capables de déclencher une sécrétion de GLP-1 avec une intensité comparable au composé issu du brevet Exelixis, le composé **3** (Figure 54).

Optimisation du kinétophore

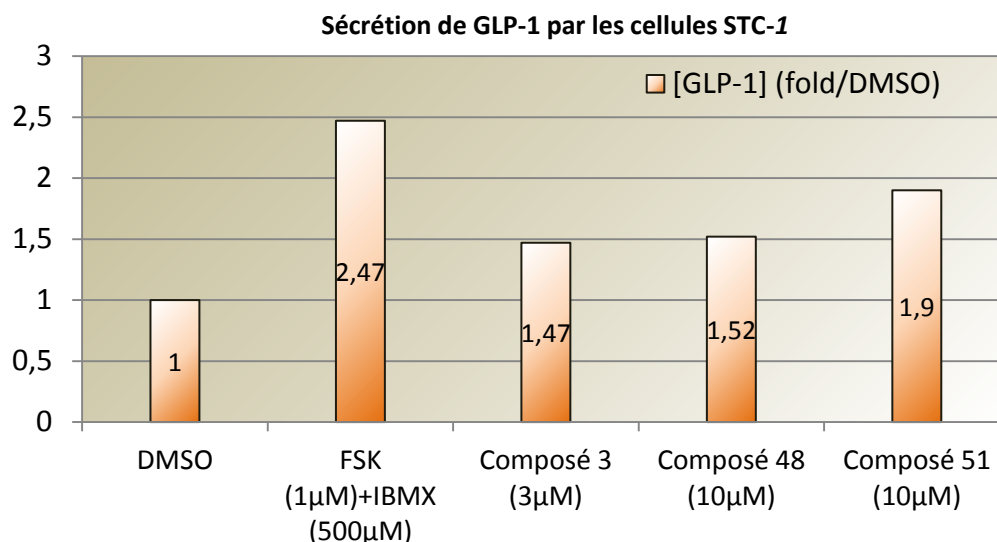
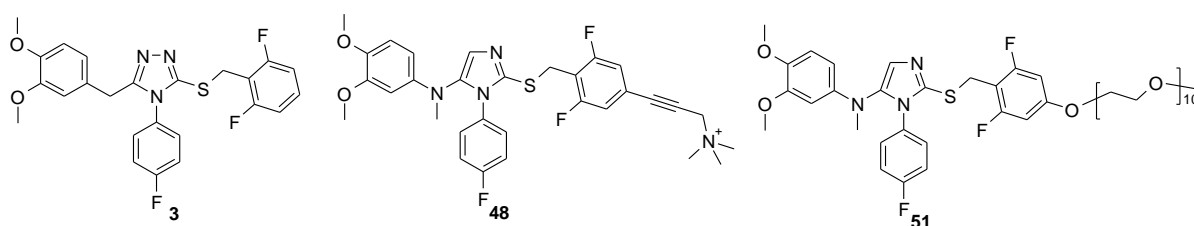


Figure 54 : Stimulation de la sécrétion de GLP-1 par des cellules entéroendocrines STC-1 en présence d'agonistes de TGR5. FSK = forskoline. IBMX = 3-isobutyl-1-méthylxanthine. FSK + IBMX : association permettant d'obtenir une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc, utilisée ici comme contrôle positif. DMSO = diméthylsulfoxyde : véhicule.

Ces expériences ont permis de confirmer que les modifications apportées, dont l'ajout du kinétophore, permettent toujours la réponse cellulaire des cellules entéroendocrine L à la présence d'un agoniste puissant de TGR5. Cependant, le manque de sensibilité et de reproductibilité de ce modèle cellulaire nous a conduits à ne pas l'utiliser comme outil de classement des composés, mais uniquement comme moyen de vérifier la capacité des composés issus de cette série chimique à déclencher une sécrétion de GLP-1.

La bonne activité des composés portant un kinétophore, en particulier des composés **48**, **49**, **50**, **51**, **52** et **54** associée à leur capacité à déclencher une sécrétion de GLP-1 *in vitro* nous ont amenés à étudier plus en détails ces molécules, en particulier leurs propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques.

3. Evaluation des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques.

L'objectif de ces évaluations est de déterminer quel(s) composé(s) est(sont) le(s) meilleur(s) candidat(s) pour être utilisé(s) chez l'animal afin d'établir la preuve de concept de l'intérêt d'agonistes topiques intestinaux de TGR5 dans le traitement du diabète.

Les données obtenues permettront également de rationaliser les résultats qui seront obtenus *in vivo* et de définir si certains de ces paramètres peuvent être prédictifs d'une non-absorption et d'une exposition systémique faible.

a) Propriétés physicochimiques

Les deux propriétés physicochimiques étudiées pour ces composés ont été la solubilité aqueuse apparente et le coefficient de partage, ou logD. Le logD est un dérivé du logP plus adapté aux milieux biologiques. En effet, il correspond au logarithme de la concentration d'un composé dans une phase organique (l'octanol) mimant la lipophilie de la membrane plasmique, divisée par la concentration de ce même composé dans un milieu aqueux tamponné (ici à pH 7,4) mimant les compartiments aqueux de l'organisme, là où le logP utilise simplement l'eau distillée.

$$\text{LogD} = \frac{[C]_{\text{octanol}}}{[C]_{\text{tpn pH 7,4}}}.$$

Solubilité et logD sont informatives quant au comportement du composé dans le milieu biologique. En particulier, le logD est un bon indicateur de la capacité d'une molécule à passer au travers des membranes. Ainsi, si le logD est trop élevé (composé trop lipophile), alors le composé aura tendance à rester dans les membranes cellulaires, et donc à ne pas diffuser au travers de cette membrane. De même, un composé avec un logD trop faible ne pourra pas diffuser à travers la membrane, car il ne pourra pas s'y solubiliser, le temps d'atteindre le compartiment cytosolique par exemple.

La mesure de la solubilité est effectuée après dilution du composé à 10mM dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) dans un milieu aqueux tamponné à pH 7,4 par du tampon phosphate salin (PBS). Cette méthodologie permet donc la mesure de la solubilité cinétique apparente après 24h d'agitation du mélange. Dans nos conditions, la limite haute de la mesure, fixée par la concentration maximale possible atteinte par le composé, est de 200 μM .

Concernant la mesure du logD, le composé, à 10mM dans le DMSO, est mélangé à un mélange 50/50 octanol/PBS, et l'ensemble est agité 24h. La limite de cette mesure est que la méthode de dosage peut avoir une limite de détection trop basse pour détecter le composé dans la phase dans laquelle il est le moins concentré. Dans notre cas, la mesure du logD pour les composés portant des mPEG d'une quarantaine d'unités de longueur a souffert de cette limite. Le logD a donc été calculé en considérant la concentration du composé dans la phase où il était le moins concentré comme étant inférieure à la limite de détection (ici la phase octanol).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-après (Tableau 8) :

Composé	14	48	49	50	51	52			53
Type de kinétophore	Ø	N ⁺	N ⁺	SO ₃ ⁻	mPEG (n=10)	mPEG (n=15)			mPEG (n=41)
						(n=13)	(n=16)	(n=19)	
Solubilité (µM)	6,3	≥ 200	≥ 200	≥ 200	181	≥ 200			≥ 200
LogD	3,5	1,0	0,9	0,8	2,1	2,0	1,5	1,0	<0
cLogD	6,63	5,93	5,36	4,15	5,30	4,90	4,51	4,12	1,23
ALogP	6,63	5,94	5,23	3,84	5,30	4,91	4,52	4,13	1,25
PSA (Å ²)	65	65	77	140	166	194	222	249	453

Tableau 8 : Solubilité, logD mesurés, et paramètres calculés par le logiciel Pipeline Pilot (cLogD, ALogP et PSA) du composé 14 et des composés portant un kinétophore.

La méthode de dosage utilisée est la spectrométrie de masse, en mode MRM (pour Multiple Reaction Monitoring). Le dosage du composé **52** a donc pu être réalisé à trois longueurs de mPEG différentes, pour affiner les relations longueur de PEG-propriétés.

Il apparaît tout d'abord évident que la présence d'un kinétophore, groupement polaire et hydrophile par nature, augmente drastiquement la solubilité. Le logD est également impacté, avec une nette diminution dans tous les cas, traduisant une diminution de la lipophilie de la molécule. On notera également que les kinétophores ioniques ont un effet relativement comparables, qu'ils soient anioniques ou cationiques. L'augmentation de la longueur de la chaîne mPEG se traduit quant à elle par une diminution progressive du logD, qui devient d'ailleurs négatif pour le composé **53**.

Enfin, Nous avons calculé en utilisant le logiciel Pipeline Pilot des paramètres tels que le AlogP ou la PSA, qui sont classiquement utilisés pour prédire la capacité d'un composé à passer la barrière intestinale^{73, 116}. Cependant, que ce soit pour le ALogP ou le cLogD, on constate une différence importante entre le paramètre calculé et le paramètre mesuré. Cette différence importante peut être expliquée par une inadéquation de la méthode de calcul avec les particularités structurales de nos composés portant un kinétophore. Cette méthode de calcul repose en effet sur la définition des contributions relatives de chacun des atomes de la molécule au AlogP de cette molécule¹¹⁷. Or la validité de ces contributions relatives diminue avec l'augmentation de la taille de la molécule, et est surtout vérifiée pour des molécules neutres ou zwitterioniques, ce que ne sont pas nos composés. Concernant la surface polaire dont nous reparlerons par la suite, on constate ici que même si c'est un paramètre participant à la description de la polarité des composés, elle n'est pas liée à la lipophilie, comme le montre l'absence de corrélation entre LogD et PSA (composé **14** vs **48**, **48** vs **50**).

b) Propriétés pharmacocinétiques

Les composés portant un kinétophore ont également été soumis à des tests simulant certaines phases des différentes étapes pharmacocinétiques (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination).

Comme nous souhaitons obtenir des composés non-absorbés par voie orale, dont l'exposition du tube digestif serait maximale et dont l'exposition systémique serait non significative pharmacologiquement, il faut que les composés soient stables dans le tube digestif et qu'ils ne passent pas la barrière intestinale. De plus, une métabolisation rapide de la fraction absorbée pourrait renforcer leur aspect non-systémique. Des paramètres comme la stabilité sur milieu gastrique et intestinal simulés, la perméabilité membranaire sur cellules Caco2 et la stabilité microsomale ont été mesurés.

➤ Stabilité dans des milieux gastriques et intestinaux simulés à jeun.

Les milieux gastriques et intestinaux simulés à jeun sont des reconstitutions artificielles des fluides naturels correspondants, mais dénués de toute activité enzymatique. La stabilité dans ces milieux permet de s'assurer que les composés étudiés sont chimiquement stables dans ces milieux. Seul le composé **48** a été évalué sur ce test. Il s'est avéré parfaitement stable dans ces conditions, sur des durées de 6h pour le milieu gastrique et 24h pour le milieu intestinal.

➤ Perméabilité sur cellules Caco2

La perméabilité sur cellules Caco2 est un paramètre important pour notre projet. Ce test utilise comme modèle cellulaire de la barrière intestinale une lignée de cellules de cancer colorectal, les cellules Caco2. Cultivées dans les conditions adéquates, elles se développent en formant une monocouche de cellules jointives, liées par des jonctions serrées (Figure 55). Cette monocouche est considérée comme un bon modèle de barrière intestinale. Ce test consiste à incuber une solution du composé du côté apical (A) ou basolatéral (B) de la monocouche de cellules, cultivées sur un insert, et de doser après un temps donné (60 min) le composé dans les deux compartiments. Trois paramètres sont ainsi mesurés : la perméabilité apparente (P_{app}) de A vers B, la perméabilité apparente de B vers A, et le ratio de la seconde sur la première, qui correspond à l'efflux actif. En effet, les cellules Caco2, comme les cellules de la membrane intestinale, expriment de nombreux transporteurs capables de modifier la capacité d'un composé à diffuser à travers la barrière intestinale⁶⁶.

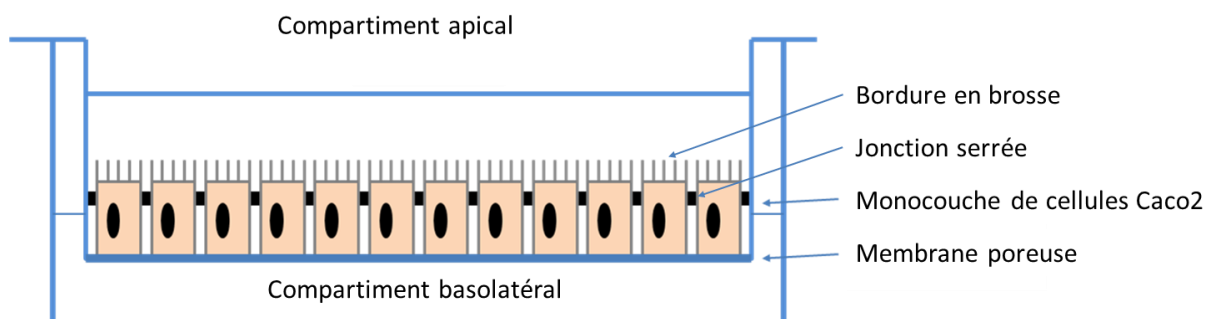


Figure 55 : Configuration mise en place pour réaliser un test de perméabilité sur cellules Caco2.

Les résultats de ce test sur les composés **37**, **49**, **50**, **51**, **52** sont présentés dans le tableau ci-après (Tableau 9). Comme précédemment pour le composé **52**, le dosage des composés **51** et **52** a été réalisé pour des longueurs définies du mélange, et non pour le mélange global.

Composé	14	48	49	50	51				52		
Type de kinétophore	Ø	N ⁺	N ⁺	SO ₃ ⁻	mPEG(\bar{n} =10)				mPEG(\bar{n} =15)		
					(n=9)	(n=10)	(n=11)	(n=12)	(n=13)	(n=16)	(n=19)
PSA (Å ²)	65	65	73	140	157	166	176	185	194	222	249
P _{app} A->B (.10 ⁻⁶ cm/s)	4,4	0,08	0,02	0,03	11	8,3	5,3	3,6	<0,2	<0,2	<0,2
P _{app} B->A (.10 ⁻⁶ cm/s)	5,3	0,24	0,22	19	19	17	15	15	38	25	13
Efflux actif	1,2	3,1	14	636	1,7	2,0	2,9	4,3	>191	>128	>69

Tableau 9 : Résultats des tests de perméabilité sur cellules Caco 2 réalisés sur certains composés portant un kinétophore.

Signification des valeurs de perméabilité obtenues lors d'un test Caco2 :

0-2.10⁻⁶ cm.s⁻¹ : perméabilité faible (en rouge)

2-20.10⁻⁶ cm.s⁻¹ : perméabilité moyenne (en jaune)

20-60.10⁻⁶ cm.s⁻¹ : perméabilité forte (en vert)

« <0,2 » : valeur de concentration dans le compartiment receveur inférieure à la limite de détection de la méthode de dosage.

Plusieurs conclusions ont pu être tirées de ces expériences.

Premièrement, l'ajout d'un kinétophore ionique modifie drastiquement la perméabilité par rapport au composé initial. Selon la charge présente, il semble que le composé puisse être pris en charge par certains transporteurs, résultant en un efflux actif important pour le composé **50**, alors qu'il reste relativement faible pour les composés **48** et **49**. Quoiqu'il en soit, la perméabilité de ces composés au niveau intestinal est supposée être très faible.

Ensuite, pour les composés mPEGylés, on constate une nette diminution de la perméabilité membranaire avec l'allongement de la chaîne^b. Il est cependant assez surprenant d'observer une augmentation de la perméabilité sur les chaînes courtes par rapport au pharmacophore non substitué (**14**). Cet effet pourrait être la résultante d'une meilleure solubilité aqueuse, ou d'une lipophilie plus adaptée.

Dans la littérature, la surface polaire (PSA) est décrite comme étant un paramètre prédictif de la fraction absorbée F_a^{70, 116}. Au-delà d'un seuil de 140 à 150 Å², la probabilité d'obtenir un composé absorbé par l'intestin est faible. Dans notre cas, il s'avère que ce paramètre est peu prédictif de la perméabilité membranaire sur cellule Caco2. En effet, on peut observer une nette différence de perméabilité sans variation de la surface polaire (composé **14** vs **48**), voire même une augmentation de la perméabilité associée à une augmentation de la surface polaire (composé **14** vs **51**_{n = 9}). Ceci ne remet évidemment pas en question la valeur

^b L'évaluation des composés **51** et **52** n'ayant pas été réalisée au sein de la même expérience, l'étude de la relation longueur-perméabilité est plus pertinente si elle est effectuée intra-composé plutôt que inter-composé.

prédictive de ce paramètre en général, mais montre qu'il n'est pas adapté à notre stratégie utilisant des kinétophores de structures chimiques variées.

Ce test de perméabilité membranaire sur cellules Caco2 confirme en tous les cas que l'utilisation de kinétophores adaptés est une solution potentielle pour diminuer la perméabilité membranaire. Je me permets toutefois de mettre une limite à la valeur prédictive de ce test. En effet, il a été conçu pour permettre de développer des composés plus perméables, et la significativité des valeurs de perméabilité faible est en réalité peu prédictive d'une réelle non-absorption intestinale. Nous avons donc décidé de ne pas classer les composés pour leur « imperméabilité membranaire » en fonction des résultats de ce test. Les valeurs obtenues nous permettent cependant d'affirmer que la perméabilité membranaire de nos composés peut être fortement diminuée par ajout d'un kinétophore adapté.

➤ Stabilité microsomale

L'étude du métabolisme des xénobiotiques est un point important en chimie médicinale, en particulier lorsque l'objectif est de développer des composés biodisponibles, et d'autant plus quand la voie d'administration est la voie orale. Dans notre cas, par l'étude de la stabilité vis-à-vis des enzymes de phase I de la métabolisation localisées dans les membranes des hépatocytes, nous souhaitons étudier l'impact des différents kinétophores sur la métabolisation des composés. En général, plus un composé est lipophile, plus il a de risque d'être métabolisé par les enzymes de phase I^{70, 118}. Nous attendons donc un effet protecteur vis-à-vis du métabolisme pour les composés portant un kinétophore.

Le tableau ci-après présente les résultats obtenus en clairance intrinsèque et en demi-vie sur des microsomes de souris mâles.

Composé	14	48	50	51				52		
Type de kintophore	Ø	N ⁺	SO ₃ ⁻	mPEG (\bar{n} =10)				mPEG (\bar{n} =15)		
				(n=9)	(n=10)	(n=11)	(n=12)	(n=13)	(n=16)	(n=19)
LogD	3,5	1,0	0,8	2,1				2,0	1,5	1,0
Cl _{int} (µL/min/mg)	1287	264	1211	840	543	351	218	137	18	2,6
Demi-vie (min)	0,7	10,6	1,2	3,1	4,0	6,9	12,5	18,5	131	929

Tableau 10 : Résultats des tests de stabilité microsomale des composés **14**, **48**, **50**, **51** et **52** sur microsomes de souris mâles.

On constate ici que la présence d'un kinétophore a un effet très variable sur la stabilité microsomale du composé. Alors que les clairances des composés **14** et **50** sont très proches, on observe un effet protecteur induit par le triméthylpropargylammonium du composé **48**. La longueur de la chaîne mPEG a quant à elle un effet protecteur évident vis-à-vis du métabolisme. L'encombrement stérique provenant de la rigidité du kinétophore (composé **48**), mais surtout de sa taille (composés mPEGylés **51** et **52**), entraîne une diminution de la

clairance intrinsèque. A l'inverse, la comparaison des kinétophores ioniques et non ioniques montre que la lipophilie du composé joue peu dans l'effet protecteur. En effet, aucune corrélation ne peut être trouvée entre le logD et la stabilité microsomale. Par exemple, alors que les composés **48** et **52** (n = 19) ont la même lipophilie (logD = 1,0), la clairance intrinsèque du composé **48** est 100 fois plus grande que celle du composé **52** (n = 19).

Ce phénomène est plutôt contre-intuitif au vu des relations précédemment décrites entre lipophilie et stabilité microsomale. Cependant, la diminution de la lipophilie des composés induite par la présence d'un kinétophore est « artificielle » et ne modifie pas la lipophilie de la partie pharmacophore du composé. A l'inverse, l'encombrement induit par le kinétophore peut lui s'opposer à la prise en charge du composé par les enzymes du métabolisme.

c) Conclusion

L'ensemble des données physicochimiques et pharmacocinétiques *in vitro* n'indiquent pas de supériorité claire d'un kinétophore sur un autre.

Les groupements sulfonate et ammonium entraînent une modification similaire de la lipophilie. La perméabilité membranaire A vers B est identique, malgré un efflux actif plus important sur le composé sulfonate. La non-perméabilité des composés ammoniums pourraient donc s'avérer moins variable, car non dépendante de mécanismes d'efflux. Le composé sulfonate est plus fragile vis-à-vis du métabolisme de phase I, mais les valeurs absolues observées pour les deux types de kinétophores chargés en font quoiqu'il en soit des composés instables.

Concernant les composés mPEGylés, il est intéressant de constater que la longueur de la chaîne mPEG influe directement sur l'effet protecteur vis-à-vis du métabolisme ainsi que sur la perméabilité membranaire (Figure 56).

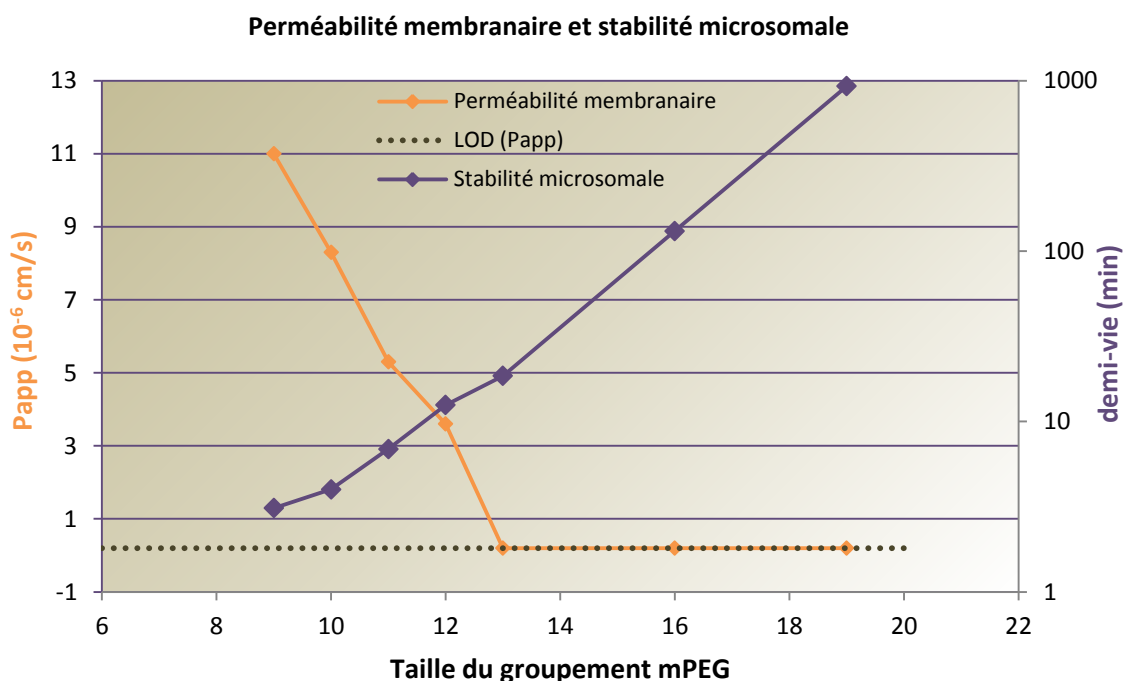


Figure 56 : Représentation graphique de la perméabilité apparente (A vers B) et de la demi-vie microsomale des composés mPEGylés en fonction de la longueur de la chaîne mPEG.

Il est toutefois probable que les courtes longueurs (autour de 10 unités) ne soient pas suffisantes pour bloquer l'absorption intestinale. A l'inverse, des longueurs élevées, autour de 40 unités, pourraient s'avérer plus efficaces que certains composés ioniques, au vu de la perméabilité sur cellules Caco2 obtenue aux longueurs proches de 15 à 20 unités.

Ces bons résultats préliminaires nous ont conduits à mettre en place des expériences *in vivo* afin de caractériser la pharmacodynamie et la pharmacocinétique de nos composés.

E. Caractérisation *in vivo* des composés à visée topique intestinale

Nous nous sommes proposés d'établir la preuve de concept de l'utilisation d'agonistes de TGR5 à visée topique intestinale permettant d'obtenir une augmentation de la sécrétion de GLP-1 bénéfique dans un contexte de diabète sans entraîner d'autres effets au niveau systémique.

Pour cela, nous devons obtenir un composé possédant plusieurs propriétés critiques après son administration par voie orale :

- une activité **GLP-1 sécrétagogue**.
- une **exposition systémique faible**

- une absence d'effet sur le volume de la vésicule biliaire.

En effet, bien que le caractère néfaste de l'effet d'agoniste de TGR5 sur la vésicule biliaire ne soit pas établi, nous avons considéré que l'absence d'effet sur la vésicule biliaire était un marqueur d'une exposition systémique pharmacologiquement non-significative.

1. Validation de l'effet GLP-1 sécrétagogue

L'évaluation *in vitro* du premier composé obtenu portant un kinétophore, le composé **48**, a permis de confirmer ses caractéristiques *in vitro* correspondant à un composé à visée topique intestinale : bonne activité sur le récepteur TGR5 ($mEC_{50} = 15 \text{ nM}$), capacité à stimuler la sécrétion de GLP-1 sur des cellules entéroendocrines L, polarité élevée ($\text{LogD} = 1,0$), faible perméabilité membranaire ($P_{app \text{ A} \rightarrow \text{B}} = 0,08 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$) (Figure 57).

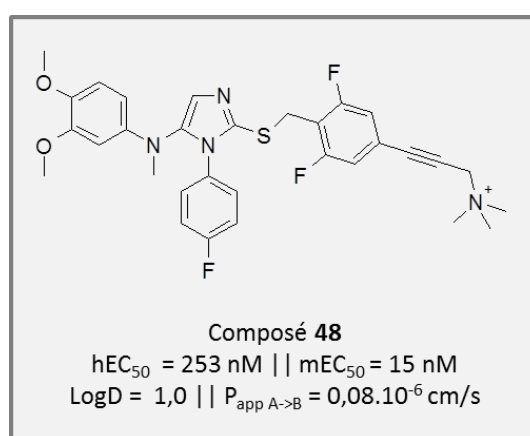


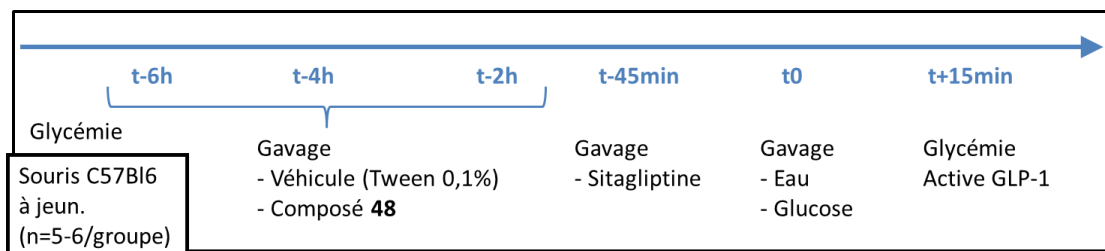
Figure 57 : Résumé des caractéristiques du composé 48.

Le composé **48** a donc été évalué chez l'animal pour son activité GLP-1 sécrétagogue. L'objectif de cette première expérience était la mise au point d'un protocole permettant d'observer un effet GLP-1 sécrétagogue de composés agonistes TGR5 modifiés pour bloquer l'absorption par le tube digestif. La sécrétion de GLP-1 a été mesurée en réponse au glucose et en absence de glucose.

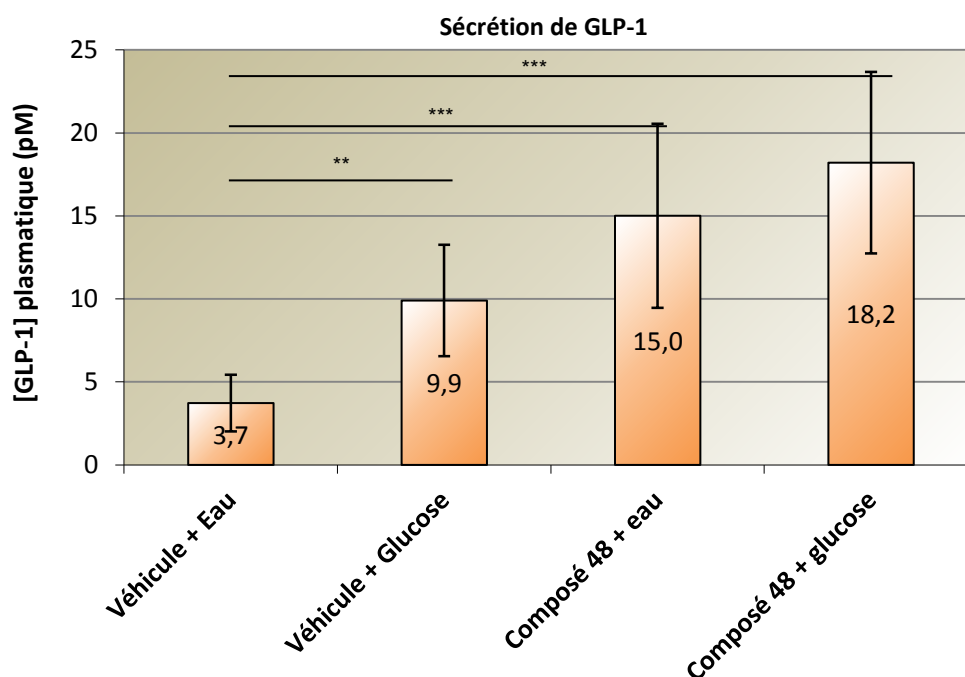
L'expérience a été conçue comme une expérience de type incrétine, précédée d'une administration du composé ou du véhicule. Dans le détail, une expérience de type incrétine consiste à administrer à l'animal un inhibiteur de DDP-4 tel que la sitagliptine, puis un bolus d'eau ou de glucose, et de comparer après un temps de donné la concentration plasmatique en GLP-1¹¹⁹. En effet, la demi-vie plasmatique courte du GLP-1 (1 à 2 min) nous oblige à utiliser un inhibiteur de l'enzyme responsable de sa dégradation pour obtenir des dosages interprétables.

L'administration du composé a été réalisée en trois fois, 6h, 4h et 2h avant le gavage par le glucose ou l'eau, afin de maximiser l'exposition du tube digestif (Figure 58). La dose de 3 fois 20 mg/kg (soit 3 fois 32 $\mu\text{mol/kg}$) se situe dans l'ordre de grandeur des doses choisies dans la

littérature pour l'étude d'agonistes de TGR5 sur la sécrétion de GLP-1^{60, 72}. Je référerai par la suite à ce protocole de gavage et de mesure par le terme protocole n°1.



A.



B.

Figure 58 : Stimulation de la sécrétion de GLP-1 chez des souris C57Bl6 mâles par un bolus glucose (2g/kg) et par le composé 48 (3x20 mg/kg) administrés par voie orale.

A : Détails du protocole.

B : Résultats sur la concentration de GLP-1 actif plasmatique.

** : $p \leq 0,01$ (test de student).

*** : $p \leq 0,001$ (test de student).

Le dosage du GLP-1 actif plasmatique dans les quatre groupes d'animaux a permis de montrer que le composé **48** est capable de stimuler la sécrétion de GLP-1 d'un facteur d'environ 4 en absence de bolus glucose, et que cet effet peut s'additionner à l'effet du glucose. Cette dernière donnée est importante, car elle nous permet d'affirmer d'une part que la sécrétion de GLP-1 en réponse à un agoniste de TGR5 n'est pas redondante avec la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose ingéré, mais aussi que la réponse à un bolus de glucose (2g/kg) en terme de sécrétion de GLP-1 n'est pas le maximum observable.

Nous avons ensuite effectué une expérience de dose-réponse sur ce composé, pour évaluer l'effet de doses plus faibles selon le protocole n°1 (sans bolus glucose) (Figure 59 A.). Dans

cette expérience, l'effet sur la vésicule biliaire a également été évalué. Pour cela, 2h après le prélèvement sanguin, trois souris du groupe contrôle et trois souris du groupe ayant reçu le composé à la plus haute dose (3x20 mg/kg) ont été sacrifiées, et la vésicule biliaire a été mesurée et prélevée pour pouvoir réaliser a posteriori un dosage de la concentration du composé dans cet organe. Enfin, les fèces du jour même et de la nuit qui a suivi l'expérience ont été récupérées pour réaliser un dosage du composé.

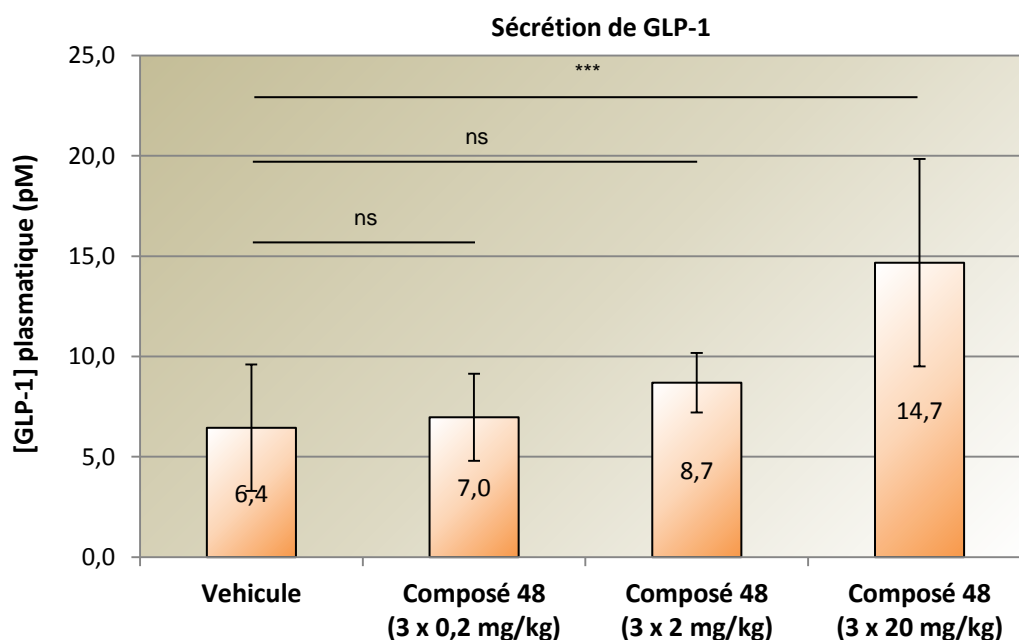
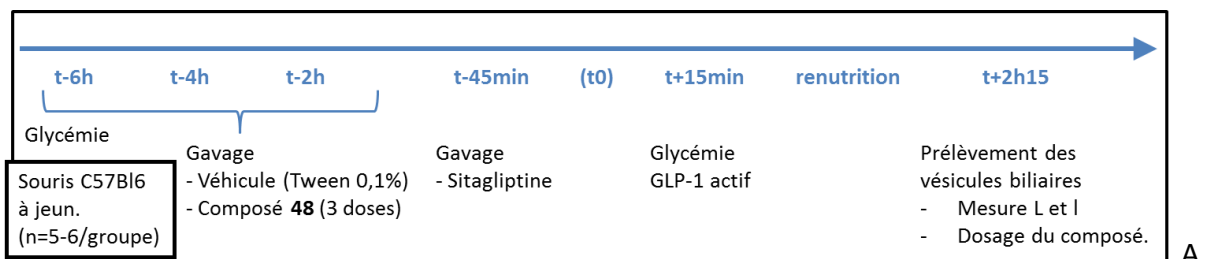


Figure 59 : Stimulation de la sécrétion de GLP-1 chez des souris C57Bl6 mâles par le composé 48 administré par voie orale.

A : Détails du protocole.

B : Résultats sur la concentration de GLP-1 actif plasmatique.

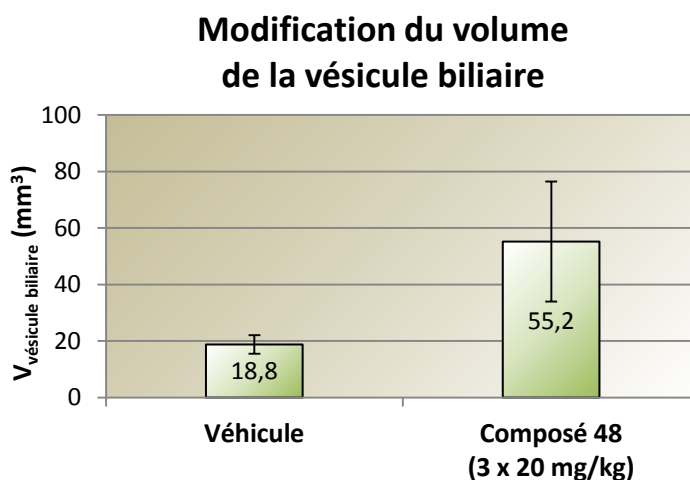
ns : non significatif (test de student).

*** : $p \leq 0,001$ (test de student).

On constate tout d'abord que l'effet GLP-1 sécrétagogue a été à nouveau observé à la dose 3x20 mg/kg, mais pas aux doses 10 et 100 fois inférieures de 3x2 mg/kg et 3x0,2 mg/kg. Le volume d'un tube digestif de souris étant inférieur à 2 mL¹²⁰, les doses administrées devraient permettre d'atteindre des concentrations supérieures de plusieurs ordres de grandeur à l'EC₅₀ mesurée *in vitro* sur le test primaire (pour une souris de 30 g à la dose de

0.2 mg/kg, 9,6 nmole de composé sont administrées, soit une concentration de 4,8 μM dans 2mL de tube digestif, pour une mEC_{50} de 15 nM). Nous nous attendions donc à pouvoir observer un effet à ces doses plus faibles. Plusieurs hypothèses peuvent cependant expliquer l'absence d'effet. Dans le cas d'une absorption intestinale trop importante du composé, une diminution de l'exposition des cellules entéroendocrines L distales ciblées pourrait survenir. Il est également possible que le composé soit en partie instable dans le tube digestif, et donc dégradé avant d'atteindre son site d'action au niveau de l'iléon et du côlon. Enfin, le timing utilisé peut être trop court, et ne permettre qu'à une faible fraction de la dose administrée d'atteindre cette partie distale du tube digestif. Le dosage du composé **48** dans les fèces a montré un recouvrement proche de 100 % entre la dose de composé présente dans les fèces et la dose administrée, ce qui permet d'invalider en partie les hypothèses d'absorption intestinale trop importante ou de dégradation dans le tube digestif.

L'étude de la vésicule biliaire a montré une nette augmentation du volume de cet organe d'un facteur 2,9 lorsque les souris ont été traitées par le composé **48** à la dose la plus élevée (Figure 60). Cet effet est en accord avec les concentrations en composé variant de 10,6 à 23,1 μM mesurée dans la vésicule. Il semble donc que malgré le bon recouvrement entre la dose administrée et la quantité présente dans les fèces, une exposition systémique non négligeable ait lieu.



A.

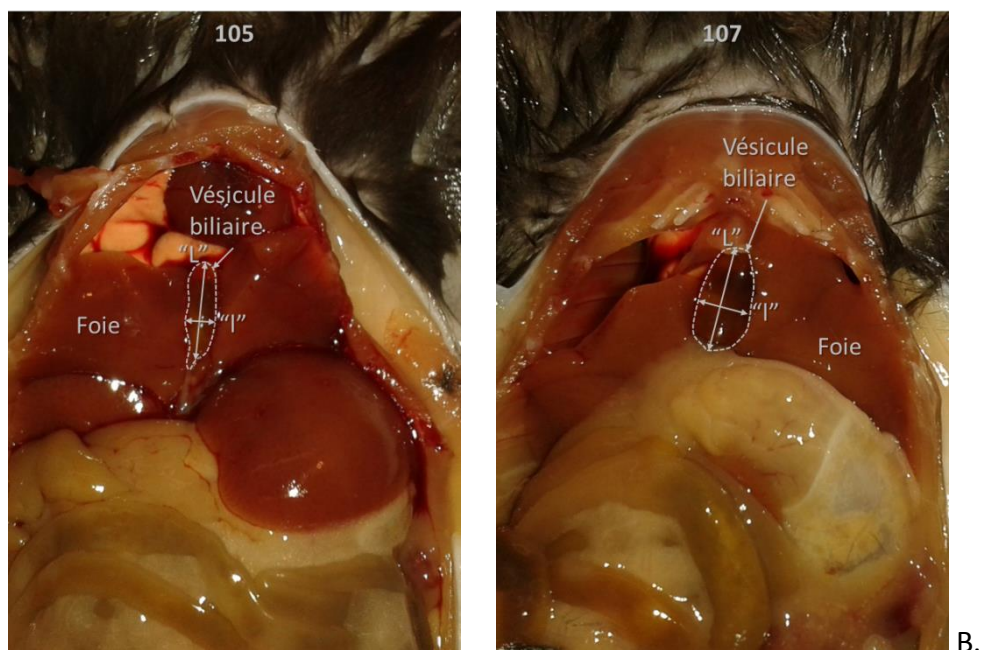


Figure 60 : Effet sur le volume de la vésicule biliaire de souris C57Bl6 mâles du composé 48 (3x20 mg/kg) administré par voie orale.

A : Volume de la vésicule biliaire (L x l x l).

B : Photographies de vésicule biliaire de souris ayant reçu le véhicule (105), ou la dose de 3 x 20 mg/kg (107).

Pour tenter de mieux comprendre ces effets sur la vésicule et de mesurer cette exposition systémique, nous avons réalisé une expérience de pharmacocinétique sur le composé **48**, afin de connaître dans le temps les concentrations du composé dans le plasma et dans la vésicule biliaire. A nouveau, une augmentation du volume de la vésicule biliaire a été observée dans le groupe ayant reçu le composé **48**, 4h après l'administration (Figure 61 A.). La mesure des concentrations du composé **48** dans la vésicule biliaire et dans le plasma permet de rationaliser cet effet. Comme précédemment observé, la concentration dans la vésicule biliaire est comprise au cours de l'expérience entre 1,9 et 9 μM , soit 100 à 600 fois son EC_{50} sur le récepteur murin (15 nM). A l'inverse, les concentrations plasmatiques très faibles ($\text{C}_{\text{max}} = 38 \text{ nM}$) sont du même ordre de grandeur que l' EC_{50} (Figure 61).

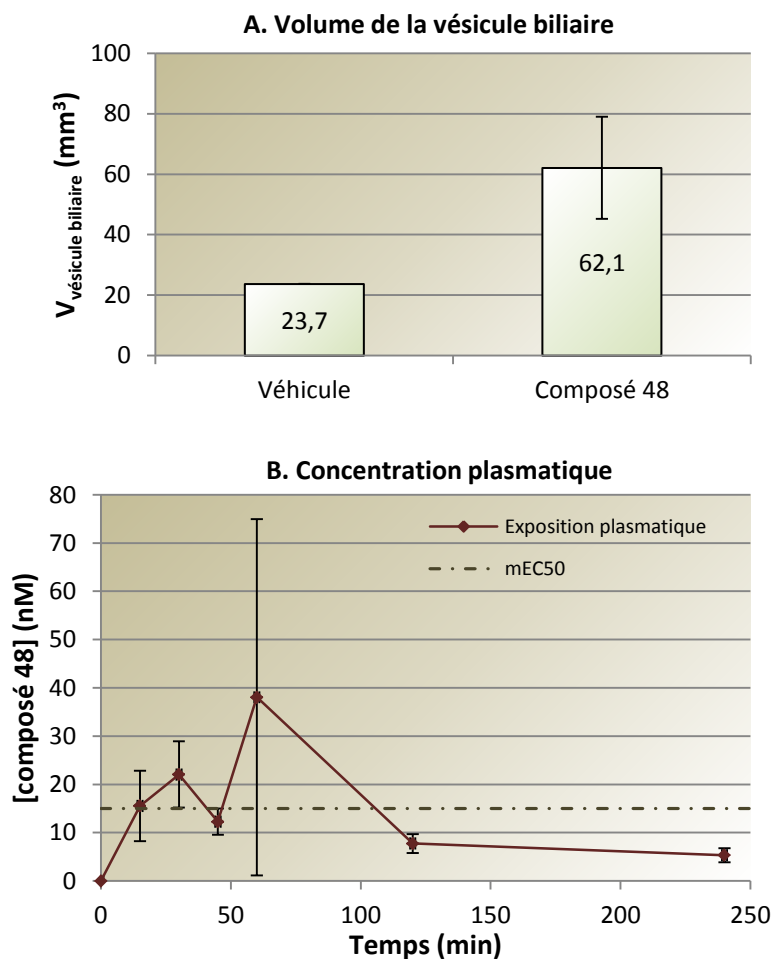


Figure 61 : Evaluation pharmacocinétique du composé 48 : volume de la vésicule biliaire et concentration plasmatique et biliaire du composé 48.

Cette donnée conforte l'aspect non-systémique de ce composé. En effet, une exposition plasmatique de cet ordre peut être considérée comme non relevant biologiquement, au vu de l'écart de un à deux ordres de grandeur décrit entre l' EC_{50} mesurée sur un système sur-exprimant le récepteur (comme notre test primaire) et celle mesurée sur un système l'exprimant de manière constitutive.

La concentration du composé dans le plasma 250 fois plus faible que dans la vésicule indique également qu'il existe un mécanisme amenant à une accumulation du composé **48** dans la vésicule biliaire, ce qui explique également l'activité pharmacologique observée sur cet organe. Une des hypothèses pouvant expliquer cet effet est la suivante : l'excrétion de composés dans la bile primaire par les hépatocytes serait un mécanisme actif, majoritairement sous la dépendance de transporteurs, plus ou moins sélectifs ; et à l'inverse, la réabsorption de la bile vers le sang serait un mécanisme passif, dépendant de la perméabilité membranaire des composés. Ceci est confirmé par l'étude des relations entre les propriétés physicochimiques et la fraction d'excrétion biliaire de 286 composés, qui montrent que les composés de masse moléculaire élevée et de perméabilité membranaire

faible ont en général une fraction d'excrétion biliaire plus importante⁷⁷. Si nos composés sont substrats de tels transporteurs, leur faible perméabilité membranaire les empêche de retourner dans le sang, d'où l'accumulation dans la vésicule biliaire.

Enfin, la quantité de composé dans la vésicule biliaire ne correspond en fait qu'à 0,03% de la dose administrée, ce qui reste cohérent avec le recouvrement entre les quantités de produit administrée et récupérée dans les fèces.

En résumé, le composé **48** est donc un agoniste de TGR5 **capable d'induire une sécrétion de GLP-1** chez la souris. Malgré sa **faible exposition systémique**, une **augmentation du volume de la vésicule biliaire** 4 heures après l'administration est observée, due à une accumulation du composé dans cet organe. Le protocole utilisé n'a malheureusement pas permis d'observer d'effet dose-réponse sur la sécrétion de GLP-1, qui aurait pu permettre de rechercher une marge thérapeutique entre les deux effets.

2. Etudes des différents kinétophores

Bien que le composé **48** valide l'aspect GLP-1 sécrétagogue attendu et que son niveau d'exposition systémique soit faible, il ne présente pas les caractéristiques pharmacocinétiques optimales.

Nous avons donc décidé d'évaluer d'autres composés afin de comparer l'impact des différents kinétophores sur le profil pharmacologique et pharmacocinétique *in vivo* des composés.

a) Composé 51

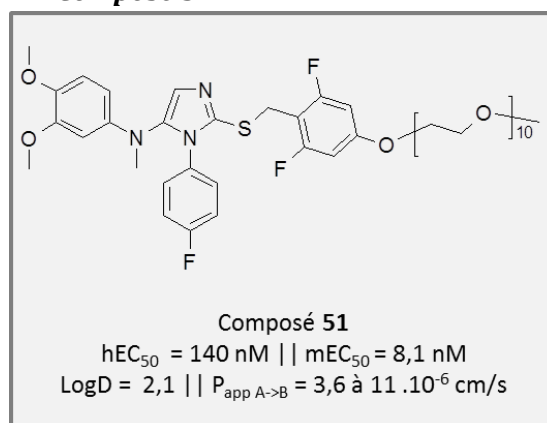


Figure 62 : Résumé des caractéristiques du composé 51.

Le composé mPEGylé **51** (Figure 62, $\bar{n} = 10$) a été évalué sur des souris C57Bl6 mâles selon le protocole n°1 (avec bolus glucose vs eau) à la dose de $3 \times 32 \mu\text{mol/kg}$ (équivalente aux 20

mg/kg du composé **48**)^c. Par rapport au composé **48**, une baisse d'efficacité a été observée, avec une augmentation de GLP-1 actif plasmatique de l'ordre d'un facteur 2 en absence de bolus glucose, et non significative en présence de bolus glucose.

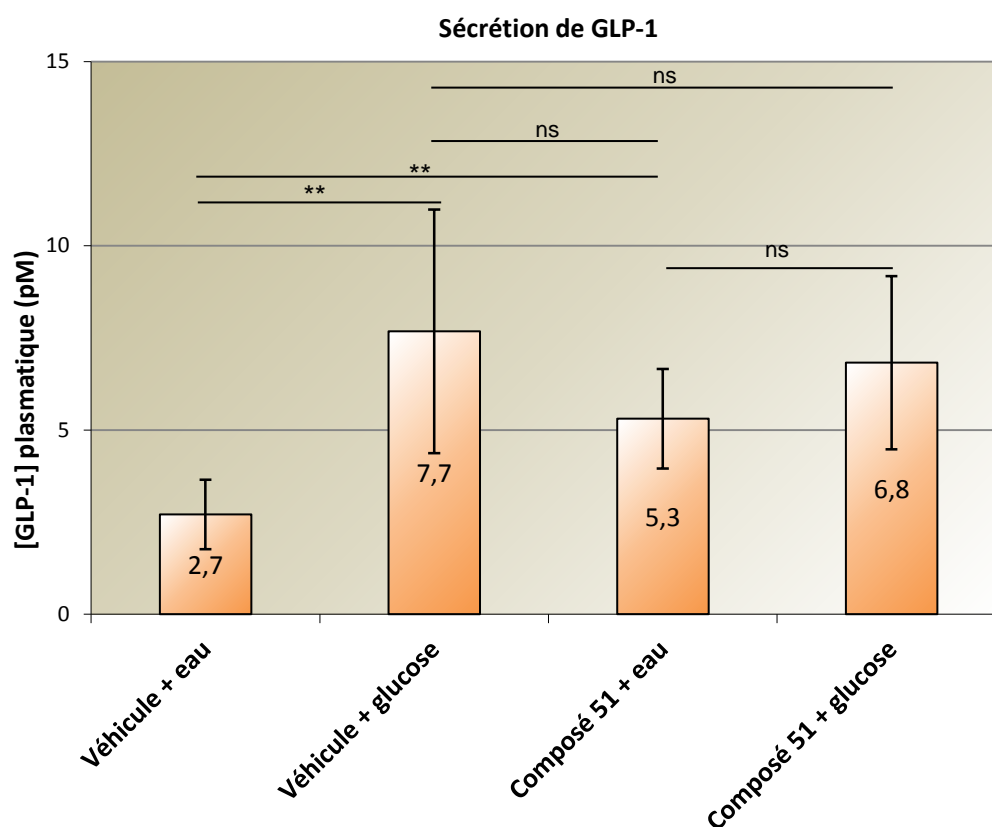
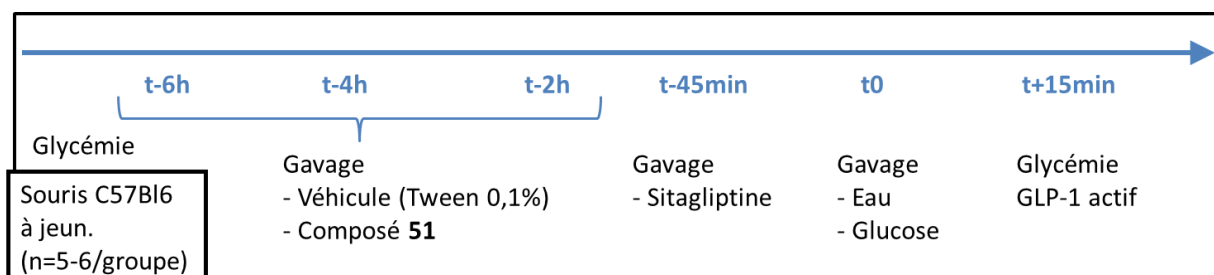


Figure 63 : Stimulation de la sécrétion de GLP-1 chez des souris C57Bl6 mâles par le composé 51 (3x32 $\mu\text{mol/kg}$) administré par voie orale.

A : Timing de l'expérience.

B : Résultats sur la concentration de GLP-1 actif plasmatique.

ns : non significatif (test de student).

** : $p \leq 0,01$ (test de student).

La meilleure perméabilité membranaire de ce composé par rapport au composé **48** pourrait être à l'origine de ce manque d'efficacité. En effet, une absorption suivie d'une métabolisation l'empêcherait d'atteindre la partie distale de l'intestin. Comme nous l'avons

^c En raison d'une différence importante de masse moléculaire entre les différents composés testés *in vivo*, les doses administrées ont été définies en $\mu\text{mol/kg}$, en non en mg/kg, pour faciliter la comparaison des résultats.

vu précédemment, l'augmentation de la longueur de la chaîne mPEG s'accompagne d'une diminution de la perméabilité membranaire. Nous avons donc décidé de ne pas poursuivre l'évaluation du composé **51**, et de nous intéresser à un composé portant une chaîne mPEG plus longue.

b) Composé 53

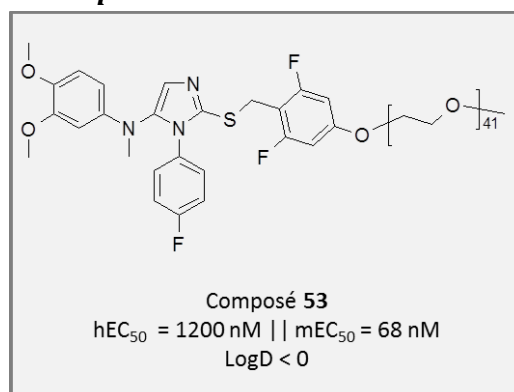


Figure 64 : Résumé des caractéristiques du composé 53.

Le composé mPEGylé **53** (Figure 64, $\bar{n} = 41$) a été évalué sur des souris C57Bl6 mâles selon le protocole n°1 (sans bolus glucose) à la dose de $3 \times 32 \mu\text{mol/kg}$. L'objectif était de vérifier qu'un composé mPEGylé actif sur TGR5 avec une chaîne suffisamment longue permettait d'obtenir une sécrétion de GLP-1 sans exposition systémique. Malheureusement, aucun effet n'a été observé sur la sécrétion de GLP-1 par rapport au contrôle.

Comme déjà présenté pour le composé **48**, une étude de la vésicule biliaire a été réalisée, en sacrifiant les souris deux heures après le prélèvement sanguin, pour mesurer et prélever l'organe. Pour approfondir cette évaluation, les souris ont été séparées en deux groupes, l'un ayant accès à la nourriture, l'autre étant maintenu à jeun. Ainsi, en plus d'évaluer l'effet sur le remplissage de la vésicule biliaire, nous avons pu étudier l'effet sur sa vidange, déclenchée par la prise de nourriture. De manière intéressante, aucun effet n'a été observé sur la vésicule biliaire, dans les groupes de souris renourries ou non renourries (Figure 65). La concentration du composé **53** variait de 0,4 à 0,6 μM , soit 16 à 57 fois moins que le composé **48** dans les mêmes conditions.

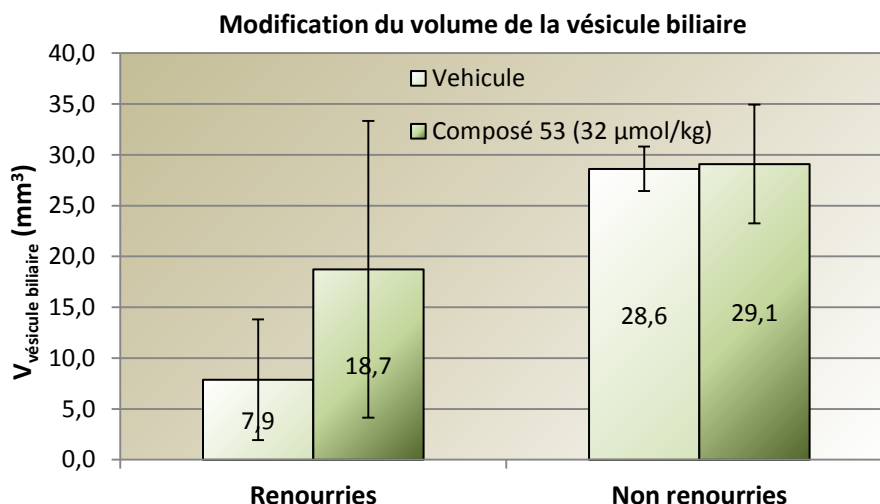


Figure 65 : Effet sur le volume de la vésicule biliaire de souris C57Bl6 mâles renourries ou non du composé 53 (3x32 µmol/kg) administré par voie orale.

Cette observation confirme la tendance de diminution de la perméabilité membranaire avec l'allongement de la chaîne mPEG observée sur les cellules Caco2, et le kinétophore mPEG ($\bar{n} = 41$) semble donc plus indiqué pour obtenir un composé à visée topique intestinale que l'ammonium quaternaire, à condition de résoudre **l'absence d'activité GLP-1 sécrétagogue**. Cette absence d'activité GLP-1 sécrétagogue peut être due à plusieurs facteurs. En premier lieu, la puissance sur mTGR5 du composé **53** est 4,5 fois plus faible que celle du composé **37** (68 nM vs 15 nM). De plus, la fenêtre de lecture choisie pour la sécrétion de GLP-1 n'est sans doute pas optimale et ne permet pas de détecter l'effet, qui survient peut être plus tardivement. Enfin, les groupements mPEG sont décrits comme capable d'interagir avec le mucus intestinal¹²¹, ce qui pourrait d'une part ralentir leur transit intestinal, et donc retarder leur arrivée au site d'action visé, mais également diminuer leur accès au récepteur membranaire.

c) Composé 50

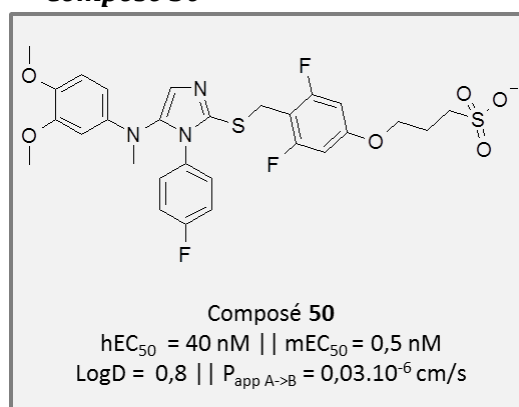
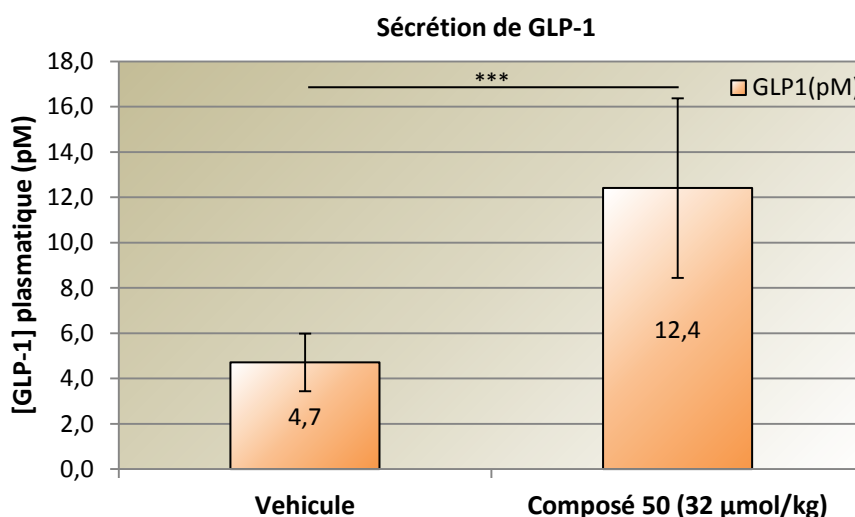


Figure 66 : Résumé des caractéristiques du composé 50.

Le composé **50** portant un groupement sulfonate (Figure 66) a été évalué sur des souris C57Bl6 mâles selon le protocole n°1 (sans bolus glucose), à la dose de 3 x 32 $\mu\text{mol/kg}$. L'objectif était d'évaluer l'effet GLP-1 sécrétagogue et d'étudier les modifications potentielles observées sur la vésicule biliaire. Comme pour le composé **53**, les souris ont été sacrifiées deux heures après le prélèvement sanguin, pour mesurer et prélever l'organe. Les souris ont été séparées en deux groupes, l'un ayant accès à la nourriture, l'autre étant maintenu à jeun.

Une augmentation de la concentration plasmatique en GLP-1 actif d'un facteur 2,6 a ainsi pu être mesurée (Figure 67). Cependant, une augmentation significative du volume de la vésicule biliaire d'un facteur 4,2 sur les souris non renourries a également été mise en évidence, liée à une concentration du composé **50** variant de 39 à 78 μM (soit prêt de 100 000 fois son EC_{50} sur TGR5 murin). De manière intéressante, seule une tendance à l'augmentation, non significative, a été mesurée sur les souris renourries.



A.

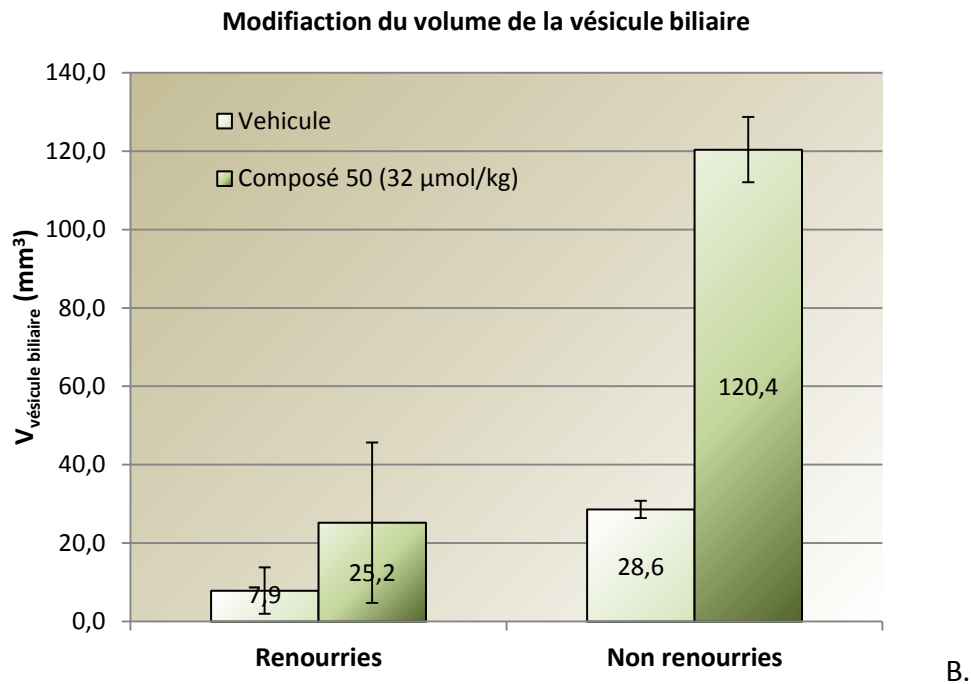


Figure 67 : Effet du composé 50 (3x32 µmol/kg) administré par voie orale sur la sécrétion de GLP-1 (A.) et sur le volume de la vésicule biliaire (B.).

*** : $p \leq 0,001$ (test de student).

La mesure des volumes de la vésicule biliaire avant et après renutrition nous a permis d'estimer la fraction d'éjection, c'est-à-dire le pourcentage de volume de bile évacuée après une vidange, déclenchée par exemple par un repas¹²².

$$FEVB = \frac{V(VB)_{avant\ vidange} - V(VB)_{après\ vidange}}{V(VB)_{avant\ vidange}}$$

Malgré l'effet observé sur le remplissage, aucun effet sur la vidange n'a ainsi pu être détecté : $FEVB_{(Comp. 50)} = 79\%$, $FEVB_{(Véhicule)} = 72\%$.

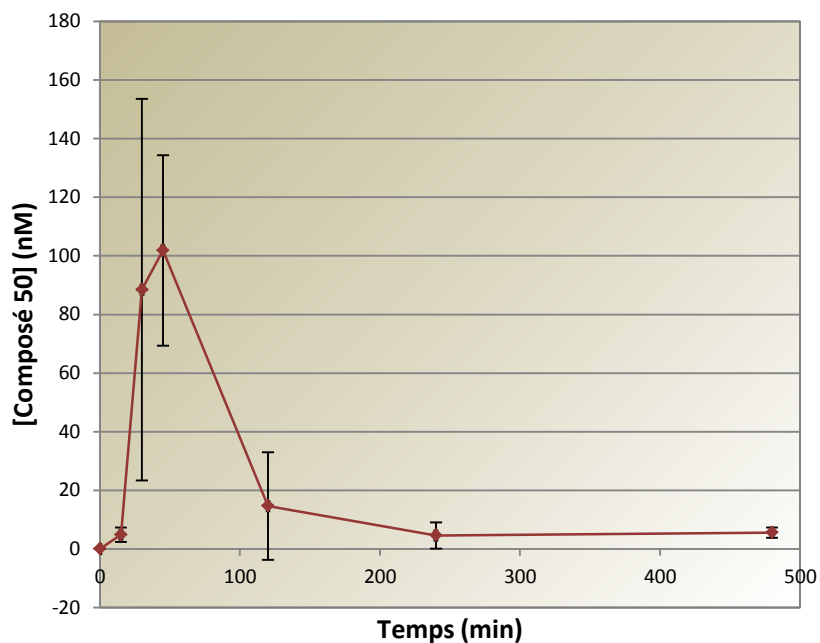
Ainsi, le composé **50** possède une **activité GLP-1 sécrétagogue in vivo**, associé à une **augmentation du remplissage de la vésicule biliaire, sans impact sur sa capacité de vidange** en présence de nourriture.

Malgré les concentrations très élevées dans la vésicule biliaire, un recouvrement total de la quantité de composé administrée avec celle récupérée dans les fèces a été obtenu. Ceci est en accord avec le fait que la quantité dosée dans la vésicule biliaire représente moins de 0,5% de la dose administrée.

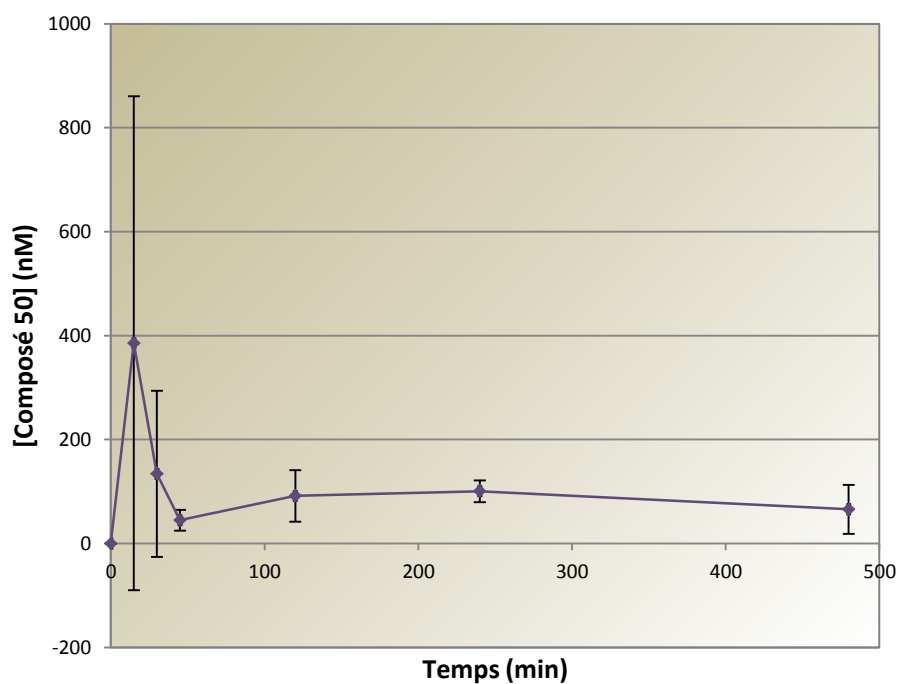
Nous avons par la suite réalisé une expérience de pharmacocinétique afin d'évaluer l'exposition systémique suite à l'administration d'une dose de 32µmol/kg. Au cours de cette expérience réalisée sur une durée de 8h, nous avons prélevé à des temps donnés non seulement du sang, la vésicule biliaire, mais aussi le foie, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et

le côlon, afin de définir la distribution du composé dans l'animal après administration par voie orale (Figure 68).

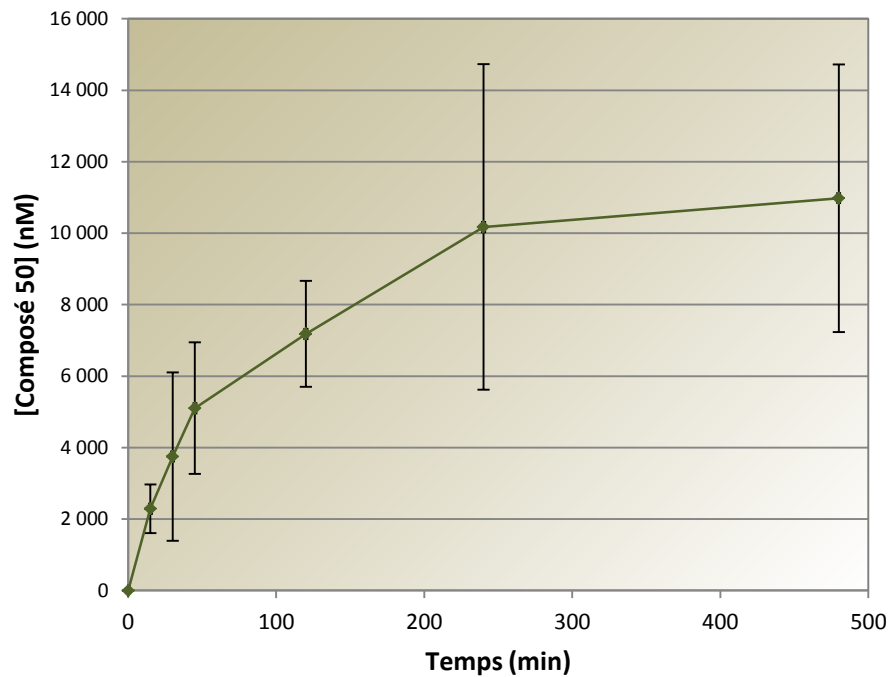
A. Concentration dans le plasma



B. Concentration dans le foie



C. Concentration dans la vésicule biliaire



D. Concentration dans l'intestin

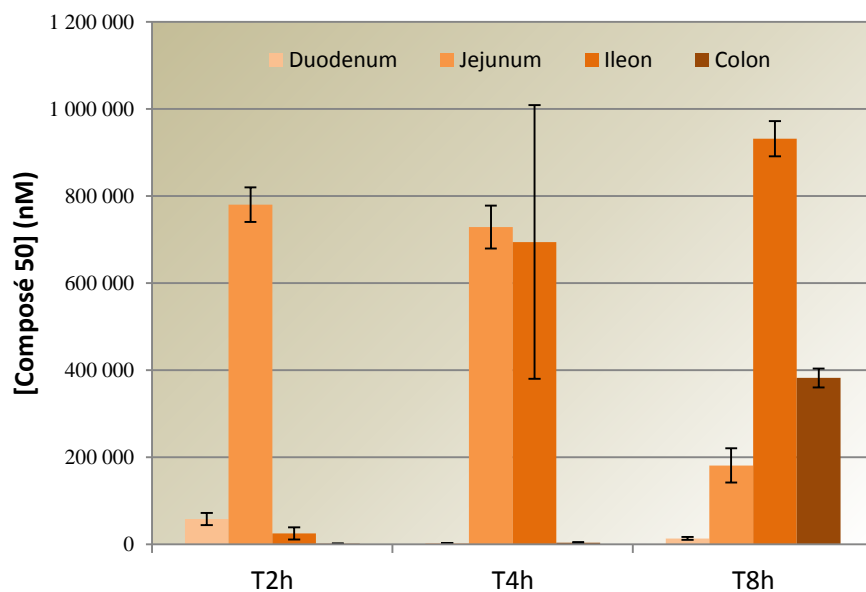


Figure 68 : Pharmacocinétique du composé 50 chez la souris C57Bl6 après administration du composé 50 par voie orale (32 $\mu\text{mol/kg}$).

Nous avons donc pu observer un pic d'absorption rapide, d'abord au niveau hépatique ($C_{\text{max}} = 390 \text{ nM}$, $t_{\text{max}} = 15 \text{ min}$) puis au niveau plasmatique ($C_{\text{max}} = 100 \text{ nM}$, $t_{\text{max}} = 45 \text{ min}$), en moins d'une heure, suivi d'un retour à une concentration très faible, de l'ordre de la dizaine de nanomolaire dans le plasma, et de la cinquantaine de nanomolaire dans le foie. Au niveau

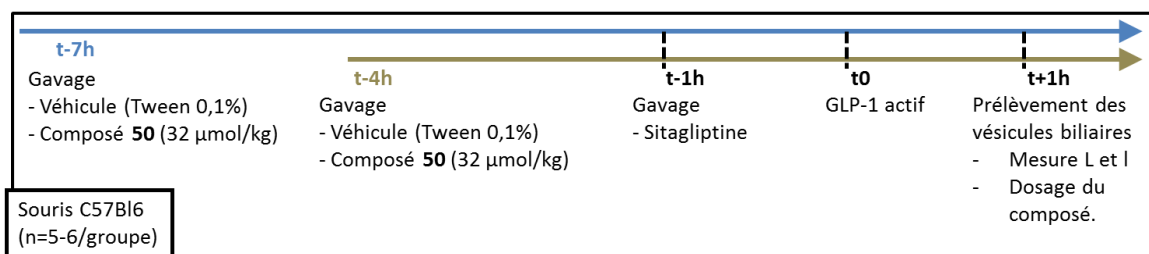
plasmatique, la concentration du composé ne dépasse pas 100 nM. L'exposition plasmatique est donc faible, malgré une concentration maximale non négligeable ($C_{\max} = 200$ fois l' EC_{50} sur système surexprimant le récepteur). A l'inverse, nous avons pu observer une accumulation progressive du composé dans la vésicule biliaire, qui atteint une concentration supérieure à 10 μ M (soit 100 fois la C_{\max} plasmatique), expliquant l'augmentation de volume de la vésicule observée précédemment.

Enfin, une information cruciale peut être tirée de l'évaluation de la concentration intestinale du composé : aux temps 2h et 4h, l'exposition de l'iléon et du côlon, segments exprimant le plus TGR5, n'est pas optimale. Le côlon n'est d'ailleurs pas du tout exposé 4 heures après l'administration. Au contraire, à 8 heures, l'iléon et le côlon sont les segments les plus exposés. Il est aussi intéressant de noter que la concentration intestinale peut dépasser les 0,5 mM (soit un million de fois l' EC_{50} du composé).

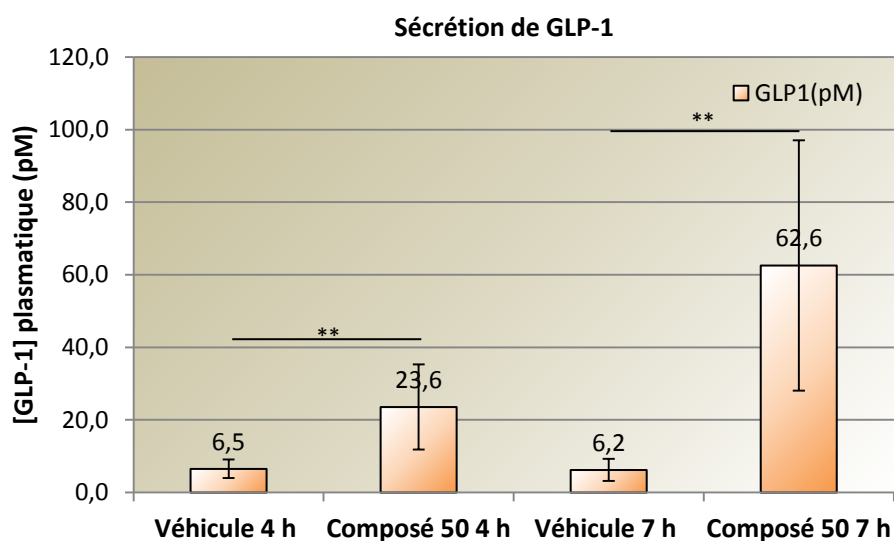
Le composé **50** est donc un agoniste de TG5 **capable d'induire une sécrétion de GLP-1** chez la souris. Malgré sa **faible exposition systémique**, une **augmentation du volume de la vésicule biliaire** est observée, due à une accumulation du composé dans cet organe. Cet effet est cependant réversible, et **ne s'oppose pas à la vidange** déclenchée par une prise alimentaire. La distribution intestinale montre qu'une optimisation du positionnement de la fenêtre de lecture de l'effet GLP-1 sécrétagogue doit être possible, puisque les segments distaux de l'intestin ne sont que peu exposés 4 heures après l'administration, et le sont beaucoup plus après 8 heures. L'effet GLP-1 sécrétagogue observé dans le protocole n°1 n'est donc potentiellement déclenché que par une fraction faible de la dose présente au niveau intestinal. Il serait donc intéressant de mesurer cet effet après un temps plus long.

3. Optimisation de la fenêtre de lecture de l'effet GLP-1 sécrétagogue

L'évaluation pharmacocinétique du composé **50** nous a donc amené à réaliser une expérience d'optimisation du timing d'administration en comparant l'effet d'une dose de 32 μ mol/kg administrée 7 heures (protocole n°2a) ou 4 heures (protocole n°2b) avant le prélèvement sanguin sur la concentration plasmatique en GLP-1 actif (Figure 69, A.).



A.



B.

Figure 69 : Effet du composé 50 (32 $\mu\text{mol/kg}$) administré par voie orale selon les protocoles n°2a (A., en bleu) et n°2b (A., en brun) sur la sécrétion de GLP-1 (B.).

** : $p \leq 0,01$ (test de student).

Une nette augmentation de l'effet GLP-1 sécrétagogue entre les deux temps est observée : alors qu'après 4 heures, l'augmentation de la concentration en GLP-1 actif atteint un facteur 3,6 par rapport au contrôle négatif, une augmentation d'un facteur 10 de la concentration en GLP-1 actif est observée 7 heures après l'administration (Figure 69 B.). Cette augmentation de la sécrétion en GLP-1 est d'autant plus notable qu'elle a été obtenue avec une seule dose de 32 $\mu\text{mol/kg}$ de composé **50**, et non trois comme décrit dans le protocole n°1. Nous avons ainsi montré que l'efficacité de l'effet GLP-1 sécrétagogue est corrélée avec la distribution intestinale du composé.

Le protocole n°2a permet également d'évaluer l'effet sur la vésicule sans le minimiser. En effet, on constate que l'effet sur la vésicule biliaire est stable entre 5 heures et 8 heures après l'administration (Figure 70). Cette stabilité était attendue, du fait de la stabilité de la concentration du composé dans la vésicule à ces deux temps (Figure 68 C.).

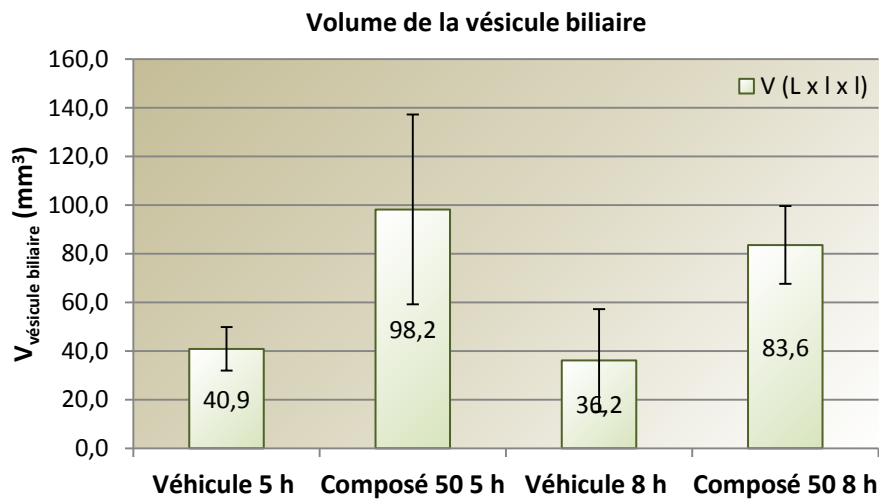
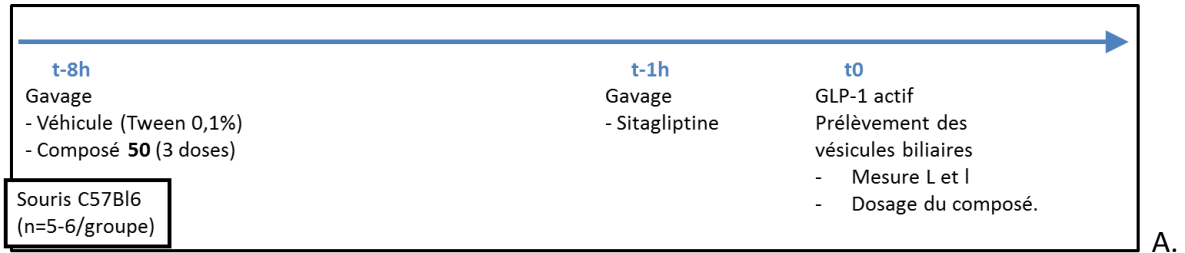


Figure 70 : Effet du composé 50 (32 $\mu\text{mol/kg}$) administré par voie orale selon les protocoles n°2a et n°2b sur le volume de la vésicule biliaire.

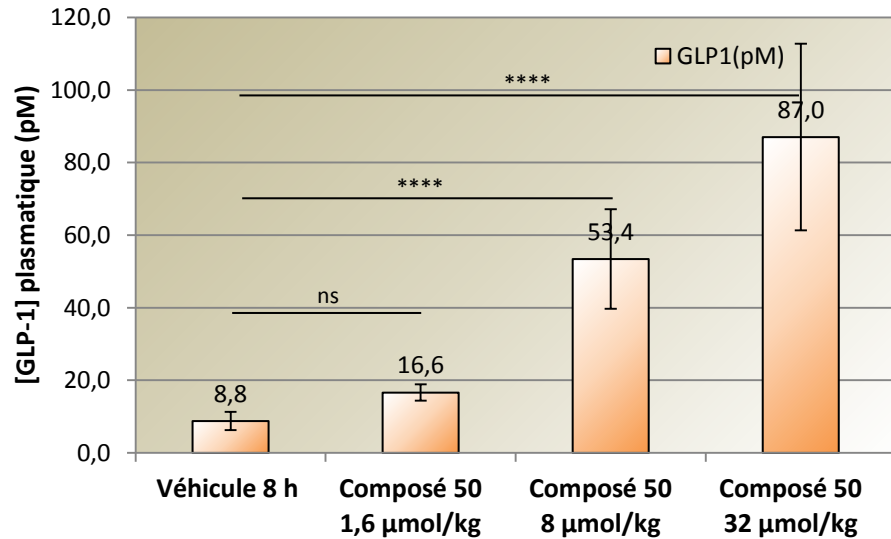
Ces données participent à prouver que l'effet GLP-1 sécrétagogue observé est obtenu via une exposition intestinale et non systémique. En effet, tout comme l'effet sur la vésicule biliaire est corrélé à la concentration dans cet organe, l'effet sur la sécrétion intestinale de GLP-1 est lui aussi corrélé à la concentration iléale et colique du composé, et non à sa concentration plasmatique.

Ces résultats prometteurs nous ont permis d'investiguer la possibilité d'obtenir un effet GLP-1 sécrétagogue à une dose n'entraînant pas d'effet systémique, contrairement à la dose de 32 $\mu\text{mol/kg}$. Nous avons donc réalisé une expérience de dose-réponse en utilisant le protocole n°3, dérivé du protocole n°2a : une seule dose a été administrée 8 heures avant le prélèvement de sang et de la vésicule biliaire. Le composé **50** a ainsi été évalué aux doses de 32 $\mu\text{mol/kg}$, 8 $\mu\text{mol/kg}$ et 1,6 $\mu\text{mol/kg}$ (Figure 71 A.).

Optimisation du kinétophore



Sécrétion de GLP-1



Volume de la vésicule biliaire

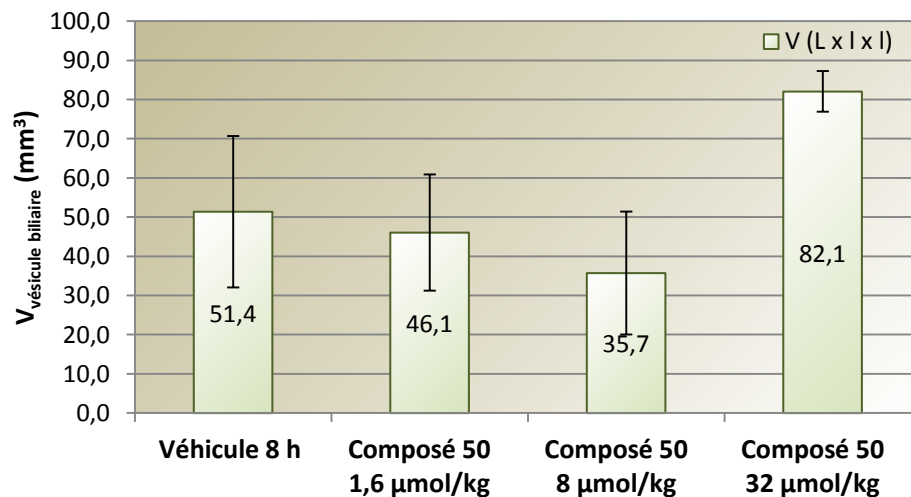


Figure 71 : Effet du composé 50 administré par voie orale (t-8h, A.) sur la sécrétion de GLP-1 (B.) et sur le volume de la vésicule biliaire (C.)

**** : $p \leq 0,0001$ (ANOVA - test de Dunnet).

A nouveau, à la dose de 32 $\mu\text{mol/kg}$, une augmentation d'un facteur 10 de la concentration plasmatique en GLP-1 actif est mesurée. A une dose 4 fois moindre (8 $\mu\text{mol/kg}$), l'effet GLP-1 sécrétagogue est maintenu, avec une augmentation d'un facteur 6 de la concentration en GLP-1 actif plasmatique. Enfin, à la dose de 1,6 $\mu\text{mol/kg}$, un faible effet sur la concentration de GLP-1 plasmatique est mesuré, avec une augmentation d'un facteur inférieur à 2.

Cet effet dose-réponse est également observé sur le volume de la vésicule biliaire. Alors que la dose de 32 $\mu\text{mol/kg}$ entraîne, comme précédemment, une augmentation du volume de la vésicule biliaire (d'un facteur 1,6) est observée, les doses inférieures de 8 $\mu\text{mol/kg}$ et 1,6 $\mu\text{mol/kg}$ sont sans effet sur le volume de la vésicule biliaire.

En résumé, cela montre qu'il existe une dose, ici 8 $\mu\text{mol/kg}$ pour le composé **50**, qui permet d'observer un **effet GLP-1 sécrétagogue intense sans effet sur la vésicule biliaire**, reflétant une **faible exposition systémique**.

F. Conclusion sur l'optimisation du kinétophore

Cette dernière expérience est une étape importante dans le processus d'obtention d'un composé topique intestinal, agoniste de TGR5, GLP-1 sécrétagogue.

En effet, comme nous avons pu le constater au cours de l'évaluation des composés portant un kinétophore, un phénomène d'accumulation dans la vésicule biliaire entraîne une différence de concentration de plusieurs ordres de grandeur entre la concentration dans la vésicule et la concentration plasmatique. L'effet sur le volume de la vésicule biliaire peut donc être considéré comme une amplification de l'effet de la fraction systémique du composé administré par voie orale. A l'inverse, l'effet GLP-1 sécrétagogue est quant à lui corrélé à la concentration de l'agoniste dans les segments distaux de l'intestin.

L'obtention d'un effet GLP-1 sécrétagogue sans effet sur la vésicule biliaire peut donc être considéré comme la preuve de concept de l'efficacité *in vivo* d'un agoniste de TGR5 à visée topique intestinale à stimuler la sécrétion de GLP-1 par les cellules entéroendocrines L intestinales, sans entraîner d'effets annexes par une activation du récepteur au niveau systémique. De plus, la corrélation entre la distribution intestinale en composé et l'effet GLP-1 sécrétagogue et le découplage dans le temps entre cet effet et la concentration plasmatique montre que la sécrétion de GLP-1 est bien déclenchée par la présence du composé dans l'intestin, et non dans le sang.

Enfin, l'optimisation du protocole d'étude *in vivo* de ces composés au profil pharmacocinétique atypique a permis d'aboutir au protocole n°3. Ce protocole nous permet non seulement une étude des effets dose-réponse des composés, mais aussi une meilleure comparaison des composés entre eux, et enfin la possibilité d'envisager des expériences plus approfondies sur le potentiel thérapeutique antidiabétique des composés obtenus. Nous avons prévu par exemple une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale pour évaluer la capacité du composé **50** à favoriser la gestion de l'hyperglycémie post-prandiale.

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était d'apporter des éléments de réponse à la question suivante : *dans quelle mesure le récepteur TGR5 peut-il être considéré comme une cible thérapeutique dans le traitement du diabète, du syndrome métabolique, et des complications associées ?*

L'analyse des données de la littérature nous a amené à envisager un ciblage de TGR5 restreint au tractus gastro-intestinal, et nous nous sommes donc proposé de réaliser la preuve de concept chez l'animal de l'intérêt de l'utilisation d'agonistes topiques intestinaux de TGR5 dont l'administration puisse conduire à une augmentation de la sécrétion de GLP-1 qui soit bénéfique dans la gestion de l'hyperglycémie chez des sujets diabétiques, sans entraîner d'autres effets non voulus tels que des troubles hémodynamiques ou des modifications de la fonction de la vésicule biliaire.

Pour atteindre cet objectif la stratégie de chimie médicinale employée a été le développement de composé topiques intestinaux conçus comme une association d'un groupement pharmacophore, agoniste de TGR5, et d'un groupement kinétophore, capable de moduler la pharmacocinétique de l'ensemble, et en particulier de bloquer l'absorption intestinale.

Un premier travail d'optimisation du pharmacophore a donc été réalisé. A partir de composés décrits dans la littérature et d'autres issus d'un criblage à haut-débit en interne, nous avons pu obtenir une quarantaine de composés possédant des puissances atteignant l'ordre du nanomolaire sur le récepteur TGR5, soit une amélioration d'un facteur 1000 par rapport au composé de départ. Ce processus a nécessité le développement d'une méthodologie de synthèse permettant l'accès au motif hétérocyclique 5-amino-2-thioimidazole très peu décrit dans la littérature. Ce développement a donné lieu à une publication dans Tetrahedron letters.

L'étude des relations structure-activité nous a ensuite conduit à choisir une position particulière sur ces composés, sur laquelle nous avons introduit un groupement kinétophore. Ce dernier étant toléré en termes d'activité sur TGR5, cette position a été validée. Plusieurs autres composés possédant des kinétophores de taille variables, ioniques ou non, ont été synthétisés. Une caractérisation *in vitro* de ces composés a permis de montrer que l'ajout d'un kinétophore dans une position adéquate permettait de modifier de manière drastique leurs propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques sans impacter leurs propriétés pharmacologiques.

Ces bons résultats nous ont permis de passer à l'évaluation *in vivo* de ces composés à visée topique intestinale. L'étude de la pharmacocinétique *in vivo* et en particulier de la distribution s'est révélée cruciale pour la suite du projet, et a permis une optimisation importante du protocole d'étude de la pharmacodynamie des composés. Le composé **50**

évalué dans ces conditions a permis de prouver que notre stratégie permettait effectivement d'obtenir des composés à action topique intestinale, sans exposition systémique pharmacologiquement significative, ce qui constitue une preuve du concept étudié au cours de ces travaux.

Des résultats obtenus et présentés ici découlent plusieurs perspectives.

Tout d'abord, l'évaluation des composés portant des groupements mPEG de longueurs différentes a démontré la modularité de ce kinetophore. Bien qu'à l'heure actuelle, nous n'ayons pas obtenu de composé mPEGylé remplissant notre cahier des charges, nous continuons d'étudier ces composés, en particulier dans des protocoles d'étude pharmacocinétique analogues à celui mis en place pour le composé **50**, afin de rationaliser l'influence de la longueur de la chaîne sur le comportement cinétique du composé, et en particulier sur sa distribution. En parallèle, nous avons réussi à diminuer l'impact de la chaîne mPEG sur l'activité TGR5 agoniste par une modification du linker, ce qui devrait nous permettre d'obtenir des résultats confirmant ceux obtenus avec le composé **50** dans l'année à venir.

Egalement, l'optimisation du protocole d'évaluation des composés *in vivo* va permettre d'émettre des conclusions plus sûres concernant les caractéristiques des futurs composés à évaluer et de faciliter leur comparaison. De plus, l'optimisation du placement de la fenêtre de lecture va également permettre de réaliser une évaluation plus poussée des effets pharmacologiques des composés. En particulier, des épreuves d'hyperglycémie provoquée par voie orale vont pouvoir être réalisées, afin de valider la capacité des composés GLP-1 sécrétagogues à améliorer la gestion de l'hyperglycémie postprandiale, ce qui représente une étape supplémentaire dans le développement de composés à visée antidiabétique.

En résumé, nous pouvons affirmer que le récepteur TGR5 est une cible potentielle dans le traitement du diabète de type 2 et de ses complications métaboliques. En effet, bien que son activation puisse en théorie entraîner un ensemble d'effets pharmacologiques variés dont certains sont considérés comme indésirables, il est possible via son activation par des agonistes topiques intestinaux d'entraîner une augmentation significative de la sécrétion de GLP-1 *in vivo* tout en s'affranchissant des autres effets pharmacologiques liés à son activation au niveau systémique. Cette conclusion confirme les données récemment publiées décrivant également le développement d'agonistes à visée topique intestinale de TGR5⁷³. Ce récepteur représente donc un nouvel accès à la voie incrétine, dont le potentiel antidiabétique est désormais reconnu, et la poursuite du développement d'agonistes à visée topique intestinale de TGR5 n'en est que plus motivante.

Bibliographie

1. Wang, H.; Chen, J.; Hollister, K.; Sowers, L. C.; Forman, B. M. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* **1999**, 3, 543-53.
2. Maruyama, T.; Miyamoto, Y.; Nakamura, T.; Tamai, Y.; Okada, H.; Sugiyama, E.; Nakamura, T.; Itadani, H.; Tanaka, K. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, 298, 714-19.
3. Kawamata, Y.; Fujii, R.; Hosoya, M.; Harada, M.; Yoshida, H.; Miwa, M.; Fukusumi, S.; Habata, Y.; Itoh, T.; Shintani, Y.; Hinuma, S.; Fujisawa, Y.; Fujino, M. A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 9435-9440.
4. Watanabe, M.; Houten, S. M.; Matak, C.; Christoffolete, M. A.; Kim, B. W.; Sato, H.; Messaddeq, N.; Harney, J. W.; Ezaki, O.; Kodama, T.; Schoonjans, K.; Bianco, A. C.; Auwerx, J. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* **2006**, 439, 484-89.
5. Thomas, C.; Gioiello, A.; Noriega, L.; Strehle, A.; Oury, J.; Rizzo, G.; Macchiarulo, A.; Yamamoto, H.; Matak, C.; Pruzanski, M.; Pellicciari, R.; Auwerx, J.; Schoonjans, K. TGR5-Mediated Bile Acid Sensing Controls Glucose Homeostasis. *Cell Metabolism* **2009**, 10, 167-77.
6. Federation, T. I. D. *Diabetes Atlas*; 2006.
7. Federation, T. I. D. *Diabetes Atlas*; 2013.
8. Haslam, D. W.; James, W. P. Obesity. *Lancet* **2005**, 366, 1197-209.
9. Ng, M.; Fleming, T.; Robinson, M.; Thomson, B.; Graetz, N.; Margono, C.; Mullany, E. C.; Biryukov, S.; Abbafati, C.; Abera, S. F.; Abraham, J. P.; Abu-Rmeileh, N. M. E.; Achoki, T.; AlBuhairan, F. S.; Alemu, Z. A.; Alfonso, R.; Ali, M. K.; Ali, R.; Guzman, N. A.; Ammar, W.; Anwari, P.; Banerjee, A.; Barquera, S.; Basu, S.; Bennett, D. A.; Bhutta, Z.; Blore, J.; Cabral, N.; Nonato, I. C.; Chang, J.-C.; Chowdhury, R.; Courville, K. J.; Criqui, M. H.; Cundiff, D. K.; Dabhadkar, K. C.; Dandona, L.; Davis, A.; Dayama, A.; Dharmaratne, S. D.; Ding, E. L.; Durrani, A. M.; Esteghamati, A.; Farzadfar, F.; Fay, D. F. J.; Feigin, V. L.; Flaxman, A.; Forouzanfar, M. H.; Goto, A.; Green, M. A.; Gupta, R.; Hafezi-Nejad, N.; Hankey, G. J.; Harewood, H. C.; Havmoeller, R.; Hay, S.; Hernandez, L.; Hussein, A.; Idrisov, B. T.; Ikeda, N.; Islami, F.; Jahangir, E.; Jassal, S. K.; Jee, S. H.; Jeffreys, M.; Jonas, J. B.; Kabagambe, E. K.; Khalifa, S. E. A. H.; Kengne, A. P.; Khader, Y. S.; Khang, Y.-H.; Kim, D.; Kimokoti, R. W.; King, J. M.; Kokubo, Y.; Kosen, S.; Kwan, G.; Lai, T.; Leinsalu, M.; Li, Y.; Liang, X.; Liu, S.; Logroscino, G.; Lotufo, P. A.; Lu, Y.; Ma, J.; Mainoo, N. K.; Mensah, G. A.; Merriman, T. R.; Mokdad, A. H.; Moschandreas, J.; Naghavi, M.; Naheed, A.; Nand, D.; Narayan, K. M. V.; Nelson, E. L.; Neuhouser, M. L.; Nisar, M. I.; Ohkubo, T.; Oti, S. O.; Pedroza, A.; Prabhakaran, D.; Roy, N.; Sampson, U.; Seo, H.; Sepanlou, S. G.; Shibuya, K.; Shiri, R.; Shiue, I.; Singh, G. M.; Singh, J. A.; Skirbekk, V.; Stapelberg, N. J. C.; Sturua, L.; Sykes, B. L.; Tobias, M.; Tran, B. X.; Trasande, L.; Toyoshima, H.; van de Vijver, S.; Vasankari, T. J.; Veerman, J. L.; Velasquez-Melendez, G.; Vlassov, V. V.; Vollset, S. E.; Vos, T.; Wang, C.; Wang, X.; Weiderpass, E.; Werdecker, A.; Wright, J. L.; Yang, Y. C.; Yatsuya, H.; Yoon, J.; Yoon, S.-J.; Zhao, Y.; Zhou, M.; Zhu, S.; Lopez, A. D.; Murray, C. J. L.; Gakidou, E. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* **2014**, 384, 766-781.
10. Peeters, A.; Barendregt, J. J.; Willekens, F.; Mackenbach, J. P.; Al Mamun, A.; Bonneux, L.; NEDCOM, t. N. E. a. D. C. o. M. R. G. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med* **2003**, 138, 24-32.
11. Hall, K. D.; Heymsfield, S. B.; Kemnitz, J. W.; Klein, S.; Schoeller, D. A.; Speakman, J. R. Energy balance and its components: implications for body weight regulation. *Am J Clin Nutr* **2012**, 95, 989-94.
12. Wolf, H. K.; Tuomilehto, J.; Kuulasmaa, K.; Domarkiene, S.; Cepaitis, Z.; Molarius, A.; Sans, S.; Dobson, A.; Keil, U.; Rywik, S. Blood pressure levels in the 41 populations of the WHO MONICA Project. *J Hum Hypertens* **1997**, 11, 733-42.

13. Batsis, J. A.; Nieto-Martinez, R. E.; Lopez-Jimenez, F. Metabolic syndrome: from global epidemiology to individualized medicine. *Clin Pharmacol Ther* **2007**, 82, 509-24.
14. Scheen, A. J. Antidiabetic agents in subjects with mild dysglycaemia: prevention or early treatment of type 2 diabetes? *Diabetes Metab* **2007**, 33, 3-12.
15. Pucci, A.; Finer, N. New Medications for Treatment of Obesity: Metabolic and Cardiovascular Effects. *Canadian Journal of Cardiology* **2015**, 31, 142-152.
16. Colagiuri, S. Global Guideline for Type 2 Diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2014**, 104, 1-52.
17. Nathan, D. M.; Buse, J. B.; Davidson, M. B.; Ferrannini, E.; Holman, R. R.; Sherwin, R.; Zinman, B.; Association, A. D.; Diabetes, E. A. f. t. S. o. Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* **2009**, 52, 17-30.
18. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* **1998**, 352, 854-65.
19. Association, A. D. Standards of Medical Care in Diabetes—2008. *Diabetes Care* **2008**, 31, S12-S54.
20. Gerstein, H. C.; Miller, M. E.; Byington, R. P.; Goff, D. C.; Bigger, J. T.; Buse, J. B.; Cushman, W. C.; Genuth, S.; Ismail-Beigi, F.; Grimm, R. H.; Probstfield, J. L.; Simons-Morton, D. G.; Friedewald, W. T.; Group, A. t. C. C. R. i. D. S. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* **2008**, 358, 2545-59.
21. Epstein, B.; Sutton, D.; Rosenwasser, R.; Choksi, R. SGLT-2 inhibitors and their potential in the treatment of diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* **2015**, Volume 6, 453-467.
22. Hollander, P. A.; Elbein, S. C.; Hirsch, I. B.; Kelley, D.; McGill, J.; Taylor, T.; Weiss, S. R.; Crockett, S. E.; Kaplan, R. A.; Comstock, J.; Lucas, C. P.; Lodewick, P. A.; Canovatchel, W.; Chung, J.; Hauptman, J. Role of orlistat in the treatment of obese patients with type 2 diabetes. A 1-year randomized double-blind study. *Diabetes Care* **1998**, 21, 1288-94.
23. Garvey, W. T.; Ryan, D. H.; Look, M.; Gadde, K. M.; Allison, D. B.; Peterson, C. A.; Schwiers, M.; Day, W. W.; Bowden, C. H. Two-year sustained weight loss and metabolic benefits with controlled-release phentermine/topiramate in obese and overweight adults (SEQUEL): a randomized, placebo-controlled, phase 3 extension study. *Am J Clin Nutr* **2012**, 95, 297-308.
24. Wadden, T. A.; Hollander, P.; Klein, S.; Niswender, K.; Woo, V.; Hale, P. M.; Aronne, L. Weight maintenance and additional weight loss with liraglutide after low-calorie-diet-induced weight loss: The SCALE Maintenance randomized study. *International Journal of Obesity* **2013**, 37, 1443-1451.
25. Drucker, D. J. The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism* **2006**, 3, 153-65.
26. Campbell, J. E.; Drucker, D. J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab* **2013**, 17, 819-37.
27. Holz, G. G. Epac: A New cAMP-Binding Protein in Support of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor-Mediated Signal Transduction in the Pancreatic β -Cell. *Diabetes* **2004**, 53, 5-13.
28. Katsuma, S.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, 329, 386-90.
29. Parks, D. J.; Blanchard, S. G.; Bledsoe, R. K.; Chandra, G.; Consler, T. G.; Kliewer, S. A.; Stimmel, J. B.; Willson, T. M.; Zavacki, A. M.; Moore, D. D.; Lehmann, J. M. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* **1999**, 284, 1365-8.
30. Gloriam, D. E.; Fredriksson, R.; Schiöth, H. B. The G protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC Genomics* **2007**, 8, 338-54.
31. Alemi, F.; Kwon, E.; Poole, D. P.; Lieu, T.; Lyo, V.; Cattaruzza, F.; Cevikbas, F.; Steinhoff, M.; Nassini, R.; Materazzi, S.; Guerrero-Alba, R.; Valdez-Morales, E.; Cottrell, G. S.; Schoonjans, K.;

- Geppetti, P.; Vanner, S. J.; Bunnett, N. W.; Corvera, C. U. The TGR5 receptor mediates bile acid-induced itch and analgesia. *The Journal of Clinical Investigation* **2013**, 123, 1513-30.
32. Svensson, P. A.; Olsson, M.; Andersson-Assarsson, J. C.; Taube, M.; Pereira, M. J.; Froguel, P.; Jacobson, P. The TGR5 gene is expressed in human subcutaneous adipose tissue and is associated with obesity, weight loss and resting metabolic rate. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, 433, 563-6.
33. Poole, D. P.; Godfrey, C.; Cattaruzza, F.; Cottrell, G. S.; Kirkland, J. G.; Pelayo, J. C.; Bunnett, N. W.; Corvera, C. U. Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **2010**, 22, 814-25, e227-8.
34. Keitel, V.; Reinehr, R.; Gatsios, P.; Rupprecht, C.; Görg, B.; Selbach, O.; Häussinger, D.; Kubitz, R. The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* **2007**, 45, 695-704.
35. Keitel, V.; Ullmer, C.; Häussinger, D. The membrane-bound bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) is localized in the primary cilium of cholangiocytes. *Biol Chem* **2010**, 391, 785-9.
36. Lavoie, B.; Balemba, O. B.; Godfrey, C.; Watson, C. A.; Vassileva, G.; Corvera, C. U.; Nelson, M. T.; Mawe, G. M. Hydrophobic bile salts inhibit gallbladder smooth muscle function via stimulation of GPBAR1 receptors and activation of KATP channels. *The Journal of Physiology* **2010**, 588, 3295-3305.
37. Bala, V.; Rajagopal, S.; Kumar, D. P.; Nalli, A. D.; Mahavadi, S.; Sanyal, A. J.; Grider, J. R.; Murthy, K. S. Release of GLP-1 and PYY in response to the activation of G protein-coupled bile acid receptor TGR5 is mediated by Epac/PLC- ϵ pathway and modulated by endogenous H₂S. *Front Physiol* **2014**, 5, 420-30.
38. Yan, L.; Zaza, K.; Bedrich, M.; Robert, F. M. Gustducin couples fatty acid receptors to GLP-1 release in colon. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **2013**, 304, E651-E660.
39. Reimann, F.; Ward, P. S.; Gribble, F. M. Signaling Mechanisms Underlying the Release of Glucagon-Like Peptide 1. *Diabetes* **2006**, 55, S78-S85.
40. Simpson, A. K.; Ward, P. S.; Wong, K. Y.; Collord, G. J.; Habib, A. M.; Reimann, F.; Gribble, F. M. Cyclic AMP triggers glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag enteroendocrine cell line. *Diabetologia* **2007**, 50, 2181-9.
41. Nedergaard, J.; Bengtsson, T.; Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2007**, 293, E444-52.
42. Wijers, S. L.; Schrauwen, P.; Saris, W. H.; van Marken Lichtenbelt, W. D. Human skeletal muscle mitochondrial uncoupling is associated with cold induced adaptive thermogenesis. *PLoS One* **2008**, 3, e1777.
43. Rajagopal, S.; Kumar, D. P.; Mahavadi, S.; Bhattacharya, S.; Zhou, R.; Corvera, C. U.; Bunnett, N. W.; Grider, J. R.; Murthy, K. S. Activation of G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, induces smooth muscle relaxation via both Epac- and PKA-mediated inhibition of RhoA/Rho kinase pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2013**, 304, G527-35.
44. Fryer, R. M.; Ng, K. J.; Nodop Mazurek, S. G.; Patnaude, L.; Skow, D. J.; Muthukumarana, A.; Gilpin, K. E.; Dinallo, R. M.; Kuzmich, D.; Lord, J.; Sanyal, S.; Yu, H.; Harcken, C.; Cerny, M. A.; Cerny, M. C.; Hickey, E. R.; Modis, L. K. G protein-coupled bile acid receptor 1 stimulation mediates arterial vasodilation through a K(Ca)_{1.1} (BK(Ca))-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* **2014**, 348, 421-31.
45. Keitel, V.; Häussinger, D. Perspective: TGR5 (Gpbar-1) in liver physiology and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **2012**, 36, 412-9.
46. Pols, Thijs W. H.; Nomura, M.; Harach, T.; Lo Sasso, G.; Oosterveer, Maaïke H.; Thomas, C.; Rizzo, G.; Gioiello, A.; Adorini, L.; Pellicciari, R.; Auwerx, J.; Schoonjans, K. TGR5 Activation Inhibits Atherosclerosis by Reducing Macrophage Inflammation and Lipid Loading. *Cell Metabolism* **2011**, 14, 747.
47. Everson, G. T. Steady-state kinetics of serum bile acids in healthy human subjects: single and dual isotope techniques using stable isotopes and mass spectrometry. *J Lipid Res* **1987**, 28, 238-52.
48. Amori, R. E.; Lau, J.; Pittas, A. G. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *JAMA* **2007**, 298, 194-206.

49. Zander, M.; Madsbad, S.; Madsen, J. L.; Holst, J. J. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* **2002**, 359, 824-30.
50. Gunawardene, A. R.; Corfe, B. M.; Staton, C. A. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int J Exp Pathol* **2011**, 92, 219-31.
51. Agarwal, P.; Sanseau, P.; Cardon, L. R. Novelty in the target landscape of the pharmaceutical industry. *Nat Rev Drug Discov* **2013**, 12, 575-6.
52. Gioiello, A.; Rosatelli, E.; Nuti, R.; Macchiarulo, A.; Pellicciari, R. Patented TGR5 modulators: a review (2006 - present). *Expert Opin Ther Pat* **2012**, 22, 1399-414.
53. Sato, H.; Macchiarulo, A.; Thomas, C.; Gioiello, A.; Une, M.; Hofmann, A. F.; Saladin, R.; Schoonjans, K.; Pellicciari, R.; Auwerx, J. Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J Med Chem* **2008**, 51, 1831-41.
54. Pellicciari, R.; Gioiello, A.; Macchiarulo, A.; Thomas, C.; Rosatelli, E.; Natalini, B.; Sardella, R.; Pruzanski, M.; Roda, A.; Pastorini, E.; Schoonjans, K.; Auwerx, J. Discovery of 6 β -Ethyl-23(S)-methylcholic Acid (S-EMCA, INT-777) as a Potent and Selective Agonist for the TGR5 Receptor, a Novel Target for Diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 7958-61.
55. Genet, C.; Strehle, A.; Schmidt, C.; Boudjelal, G.; Lobstein, A.; Schoonjans, K.; Souchet, M.; Auwerx, J.; Saladin, R.; Wagner, A. Structure-activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes. *J Med Chem* **2010**, 53, 178-90.
56. Ono, E.; Inoue, J.; Hashidume, T.; Shimizu, M.; Sato, R. Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, 410, 677-81.
57. Evans, K. A.; Budzik, B. W.; Ross, S. A.; Wisnoski, D. D.; Jin, J.; Rivero, R. A.; Vimal, M.; Szewczyk, G. R.; Jayawickreme, C.; Moncol, D. L.; Rimele, T. J.; Armour, S. L.; Weaver, S. P.; Griffin, R. J.; Tadepalli, S. M.; Jeune, M. R.; Shearer, T. W.; Chen, Z. B.; Chen, L.; Anderson, D. L.; Becherer, J. D.; De Los Frailes, M.; Colilla, F. J. Discovery of 3-aryl-4-isoxazolecarboxamides as TGR5 receptor agonists. *J Med Chem* **2009**, 52, 7962-5.
58. Dehmlow, H.; Alvarez Sánchez, R.; Bachmann, S.; Bissantz, C.; Bliss, F.; Conde-Knape, K.; Graf, M.; Martin, R. E.; Obst Sander, U.; Raab, S.; Richter, H. G.; Sewing, S.; Sprecher, U.; Ullmer, C.; Mattei, P. Discovery and optimisation of 1-hydroxyimino-3,3-diphenylpropanes, a new class of orally active GPBAR1 (TGR5) agonists. *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, 23, 4627-32.
59. Ullmer, C.; Alvarez Sanchez, R.; Sprecher, U.; Raab, S.; Mattei, P.; Dehmlow, H.; Sewing, S.; Iglesias, A.; Beauchamp, J.; Conde-Knape, K. Systemic bile acid sensing by G protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1) promotes PYY and GLP-1 release. *Br J Pharmacol* **2013**, 169, 671-84.
60. Phillips, D. P.; Gao, W.; Yang, Y.; Zhang, G.; Lerario, I. K.; Lau, T. L.; Jiang, J.; Wang, X.; Nguyen, D. G.; Bhat, B. G.; Trotter, C.; Sullivan, H.; Welzel, G.; Landry, J.; Chen, Y.; Joseph, S. B.; Li, C.; Gordon, W. P.; Richmond, W.; Johnson, K.; Bretz, A.; Bursulaya, B.; Pan, S.; McNamara, P.; Seidel, H. M. Discovery of trifluoromethyl(pyrimidin-2-yl)azetidine-2-carboxamides as potent, orally bioavailable TGR5 (GPBAR1) agonists: structure-activity relationships, lead optimization, and chronic in vivo efficacy. *J Med Chem* **2014**, 57, 3263-82.
61. Lamian, V.; Rich, A.; Ma, Z.; Li, J.; Seethala, R.; Gordon, D.; Dubaquié, Y. Characterization of agonist-induced motilin receptor trafficking and its implications for tachyphylaxis. *Mol Pharmacol* **2006**, 69, 109-18.
62. Whalen, E. J.; Rajagopal, S.; Lefkowitz, R. J. Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med* **2011**, 17, 126-39.
63. Futatsugi, K.; Bahnck, K. B.; Brenner, M. B.; Buxton, J.; Chin, J. E.; Coffey, S. B.; Dubins, J.; Flynn, D.; Gautreau, D.; Guzman-Perez, A.; Hadcock, J. R.; Hepworth, D.; Herr, M.; Hinchey, T.; Janssen, A. M.; Jennings, S. M.; Jiao, W.; Lavergne, S. Y.; Li, B.; Li, M.; Munchhof, M. J.; Orr, S. T. M.; Piotrowski, D. W.; Roush, N. S.; Sammons, M.; Stevens, B. D.; Storer, G.; Wang, J.; Warmus, J. S.; Wei,

- L.; Wolford, A. C. Optimization of triazole-based TGR5 agonists towards orally available agents. *MedChemComm* **2013**, 4, 205-10.
64. Piotrowski, D. W.; Futatsugi, K.; Warmus, J. S.; Orr, S. T.; Freeman-Cook, K. D.; Londregan, A. T.; Wei, L.; Jennings, S. M.; Herr, M.; Coffey, S. B.; Jiao, W.; Storer, G.; Hepworth, D.; Wang, J.; Lavergne, S. Y.; Chin, J. E.; Hadcock, J. R.; Brenner, M. B.; Wolford, A. C.; Janssen, A. M.; Roush, N. S.; Buxton, J.; Hinchey, T.; Kalgutkar, A. S.; Sharma, R.; Flynn, D. A. Identification of Tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidine Amides as a New Class of Orally Bioavailable TGR5 Agonists. *ACS Med Chem Lett* **2013**, 4, 63-8.
65. Duan, H.; Ning, M.; Chen, X.; Zou, Q.; Zhang, L.; Feng, Y.; Leng, Y.; Shen, J. Design, synthesis, and antidiabetic activity of 4-phenoxy nicotinamide and 4-phenoxy pyrimidine-5-carboxamide derivatives as potent and orally efficacious TGR5 agonists. *J Med Chem* **2012**, 55, 10475-89.
66. Filipinski, K. J.; Varma, M. V.; El-Kattan, A. F.; Ambler, C. M.; Ruggeri, R. B.; Goosen, T. C.; Cameron, K. O. Intestinal targeting of drugs: rational design approaches and challenges. *Curr Top Med Chem* **2013**, 13, 776-802.
67. Mera, Y.; Odani, N.; Kawai, T.; Hata, T.; Suzuki, M.; Hagiwara, A.; Katsushima, T.; Kakutani, M. Pharmacological characterization of diethyl-2-((3-dimethylcarbamoyl-4-((4'-trifluoromethylbiphenyl)-2-carbonyl)amino]phenyl)acetyloxymethyl)-2-phenylmalonate (JTT-130), an intestine-specific inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein. *J Pharmacol Exp Ther* **2011**, 336, 321-7.
68. Thomas, V. H.; Bhattachar, S.; Hitchingham, L.; Zocharski, P.; Naath, M.; Surendran, N.; Stoner, C. L.; El-Kattan, A. The road map to oral bioavailability: an industrial perspective. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2006**, 2, 591-608.
69. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, 46, 3-26.
70. Varma, M. V.; Obach, R. S.; Rotter, C.; Miller, H. R.; Chang, G.; Steyn, S. J.; El-Kattan, A.; Troutman, M. D. Physicochemical space for optimum oral bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. *J Med Chem* **2010**, 53, 1098-108.
71. Charmot, D. Non-systemic drugs: a critical review. *Curr Pharm Des* **2012**, 18, 1434-45.
72. Zou, Q.; Duan, H.; Ning, M.; Liu, J.; Feng, Y.; Zhang, L.; Zhu, J.; Leng, Y.; Shen, J. 4-Benzofuranyloxynicotinamide derivatives are novel potent and orally available TGR5 agonists. *Eur J Med Chem* **2014**, 82, 1-15.
73. Duan, H.; Ning, M.; Zou, Q.; Ye, Y.; Feng, Y.; Zhang, L.; Leng, Y.; Shen, J. Discovery of Intestinal Targeted TGR5 Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes. *J Med Chem* **2015**, 58, 3315-28.
74. EXELIXIS, I.; BOLLU, V.; . BOREN, B., Clayton; . DALGARD, J., Eve; . FLATT, B., T.; . HAQ, N.; . HUDSON, S.; . MOHAN, R.; . MORRISSEY, M.; . PRATT, B.; . WANG, T.-I.; . MARTIN, R.; . GU, X.-H. TRIAZOLE AND IMIDAZOLE DERIVATIVES FOR USE AS TGR5 AGONISTS IN THE TREATMENT OF DIABETES AND OBESITY. 2010.
75. EXELIXIS, I.; BOLLU, V.; . BOREN, B., Clayton; . DALGARD, J.; . FLATT, B., T.; . HAQ, N.; . HUDSON, S.; . MOHAN, R.; . MORRISSEY, M.; . PRATT, B. TGR5 AGONISTS. 2011.
76. LEWIS, J., G.; REICH, N.; CHEN, T.; JACOBS, J. W.; CHARMOT, D.; NAVRE, M.; FINN, P.; CARRERAS, C.; SPENCER, A.; ARDELYX, I. NON-SYSTEMIC TGR5 AGONISTS. 2013/06/28, 2013.
77. Varma, M. V.; Chang, G.; Lai, Y.; Feng, B.; El-Kattan, A. F.; Litchfield, J.; Goosen, T. C. Physicochemical property space of hepatobiliary transport and computational models for predicting rat biliary excretion. *Drug Metab Dispos* **2012**, 40, 1527-37.
78. Wermuth, C. G. *The practice of Medicinal Chemistry second edition*. 2003.
79. Mihalic, J. T.; Kim, Y.-J.; Lizarzaburu, M.; Chen, X.; Deignan, J.; Wanska, M.; Yu, M.; Fu, J.; Chen, X.; Zhang, A.; Connors, R.; Liang, L.; Lindstrom, M.; Ma, J.; Tang, L.; Dai, K.; Li, L. Discovery of a new class of ghrelin receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, 2046-51.
80. Zhu, Z.; Sun, Z.-Y.; Ye, Y.; McKittrick, B.; Greenlee, W.; Czarniecki, M.; Fawzi, A.; Zhang, H.; Lachowicz, J. E. Design and discovery of 1,3-benzodiazepines as novel dopamine antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 5218-21.

81. Deprez-Poulain, R.; Cousaert, N.; Toto, P.; Willand, N.; Deprez, B. Application of Ullmann and Ullmann-Finkelstein reactions for the synthesis of N-aryl-N-(1H-pyrazol-3-yl) acetamide or N-(1-aryl-1H-pyrazol-3-yl) acetamide derivatives and pharmacological evaluation. *Eur J Med Chem* **2011**, 46, 3867-76.
82. Siddiqui, N.; Ahsan, W. Triazole incorporated thiazoles as a new class of anticonvulsants: design, synthesis and in vivo screening. *Eur J Med Chem* **2010**, 45, 1536-43.
83. Siddiqui, A. A.; Mishra, R.; Shaharyar, M.; Husain, A.; Rashid, M.; Pal, P. Triazole incorporated pyridazinones as a new class of antihypertensive agents: design, synthesis and in vivo screening. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, 21, 1023-6.
84. Wang, H.-Y.; Zhao, P.-S.; Li, R.-Q.; Zhou, S.-M. Synthesis, Crystal Structure and QuantumChemical Study on 3-Phenylamino-4-Phenyl-1,2,4-Triazole-5-Thione. *Molecules* **2009**, 14, 608-620.
85. Tang, P. C.; Lu, H. J.; Chen, Y. Q.; Zheng, H.; Song, P.; Wang, L.; Qin, Q.; Gong, A. S. Novel indoline-1- or 3,4-dihydroquinoline-1(2H)-substituted carbothiohydrazides as TPO receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**, 5670-72.
86. McDonald, I. M.; Austin, C.; Buck, I. M.; Dunstone, D. J.; Gaffen, J.; Griffin, E.; Harper, E. A.; Hull, R. A. D.; Kalindjian, S. B.; Linney, I. D.; Low, C. M. R.; Patel, D.; Pether, M. J.; Raynor, M.; Roberts, S. P.; Shaxted, M. E.; Spencer, J.; Steel, K. I. M.; Sykes, D. A.; Wright, P. T.; Xun, W. Discovery and Characterization of Novel, Potent, Non-Peptide Parathyroid Hormone-1 Receptor Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50, 4789-92.
87. Teichert, A.; Jantos, K.; Harms, K.; Studer, A. One-Pot Homolytic Aromatic Substitutions/HWE Olefinations under Microwave Conditions for the Formation of a Small Oxindole Library. *Organic Letters* **2004**, 6, 3477-80.
88. Wu, S.; Janusz, J. M.; Sheffer, J. B. An efficient one-pot synthesis of 3-aminohydantoin and 3-aminodihydrouracil derivatives. *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, 1159-63.
89. Zamansky, I.; Galvin, G.; Girardet, J.-I. POLYMORPHIC, CRYSTALLINE AND MESOPHASE FORMS OF SODIUM 2-(5-BROMO-4-(4-CYCLOPROPYLNAPHTHALEN-1-YL)-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YLTHIO)ACETATE, AND USES THEREOF. WO/2011/085009, 2011.
90. Toto, P.; Gesqui re, J.-C.; Cousaert, N.; Deprez, B.; Willand, N. UFU ('Ullmann-Finkelstein-Ullmann'): a new multicomponent reaction. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 4973-78.
91. Guram, A. S.; Rennels, R. A.; Buchwald, S. L. A Simple Catalytic Method for the Conversion of Aryl Bromides to Arylamines. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, 34, 1348-50.
92. Chan, D. M. T.; Monaco, K. L.; Wang, R.-P.; Winters, M. P. New N- and O-arylations with phenylboronic acids and cupric acetate. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 2933-36.
93. Lam, P. Y. S.; Clark, C. G.; Saubern, S.; Adams, J.; Winters, M. P.; Chan, D. M. T.; Combs, A. New aryl/heteroaryl C-N bond cross-coupling reactions via arylboronic acid/cupric acetate arylation. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 2941-44.
94. Ley, S. V.; Thomas, A. W. Modern Synthetic Methods for Copper-Mediated C(aryl)-O, C(aryl)-N, and C(aryl)-S Bond Formation. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, 42, 5400-49.
95. Citerio, L. R., Elisabetta. Saccarello, Maria Luisa. Stradi, Riccardo. Gioia, Bruno. 2-Imidazolines. III (1). 1-Aryl- and 1-acyl-2-amino-(ormethoxy)-4,5-diamino-4,5-dihydroimidazoles. Synthesis and properties. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1980**, 17, 97-101.
96. SYNGENTA; DUMEUNIER, R.; . LAMBERTH, C.; . TRAH, S. IMIDAZOLE DERIVATIVES. WO/2010/102866, 16.09.2010, 2010.
97. Lamberth, C.; Dumeunier, R.; Trah, S.; Wendeborn, S.; Godwin, J.; Schneiter, P.; Corran, A. Synthesis and fungicidal activity of tubulin polymerisation promoters. Part 3: imidazoles. *Bioorg Med Chem* **2013**, 21, 127-34.
98. Augustine, J. K. V., Veeramani. Narasimhan, Sharmila. Alagarsamy, Padma. Radhakrishnan, Anbarasi. Propylphosphonic anhydride (T3P[®]): an efficient reagent for the one-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles, 1,3,4-oxadiazoles, and 1,3,4-thiadiazoles. **2009**, 65, 9989-9996.

99. Wen, X.; Bakali, J. E.; Deprez-Poulain, R.; Deprez, B. Efficient propylphosphonic anhydride ([®]T3P) mediated synthesis of benzothiazoles, benzoxazoles and benzimidazoles. *Tetrahedron Letters* **2012**, 53, 2440-43.
100. Londregan, A. T.; Piotrowski, D. W.; Futatsugi, K.; Warmus, J. S.; Boehm, M.; Carpino, P. A.; Chin, J. E.; Janssen, A. M.; Roush, N. S.; Buxton, J.; Hinchey, T. Discovery of 5-phenoxy-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxamides as potent agonists of TGR5 via sequential combinatorial libraries. *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, 23, 1407-11.
101. Lasalle, M.; Picon, S.; Rajaa, B.; Hoguet, V.; Van Obbergen, J.; Roussel, P.; Deprez, B.; Charton, J. Access to newly functionalized imidazole derivatives: efficient synthesis of novel 5-amino-2-thioimidazoles using propylphosphonic anhydride ([®]T3P). *Tetrahedron Letters* **2015**, 56, 1011–1014.
102. Jeso, V.; Iqbal, S.; Hernandez, P.; Cameron, M. D.; Park, H.; LoGrasso, P. V.; Micalizio, G. C. Synthesis of benzoquinone ansamycin-inspired macrocyclic lactams from shikimic acid. *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, 52, 4800-4.
103. Matthew S. Tremblay; Marlin Halim, a.; Sames*, D. Cocktails of Tb³⁺ and Eu³⁺ Complexes: A General Platform for the Design of Ratiometric Optical Probes. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 7570-7577.
104. Theodora W. Greene, P. G. M. W. *Protective Groups in Organic Synthesis*. John Wiley & Sons, Inc.: 1999.
105. Pask, C. M.; Camm, K. D.; Kilner, C. A.; Halcrow, M. A. Synthesis of a new series of ditopic proligands for metal salts: differing regiochemistry of electrophilic attack at 3{5}-amino-5{3}-(pyrid-2-yl)-1H-pyrazole. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 2534.
106. Correa, A.; Tellitu, I.; Domínguez, E.; SanMartin, R. A metal-free approach to the synthesis of indoline derivatives by a phenyliodine(III) bis(trifluoroacetate)-mediated amidohydroxylation reaction. *J Org Chem* **2006**, 71, 8316-9.
107. Spingler, B.; Schnidrig, S.; Todorova, T.; Wild, F. Some thoughts about the single crystal growth of small molecules. *CrystEngComm* **2012**, 14, 751-757.
108. Fournie-Zaluski, M.-C.; Llorens-Cortes, C.; Roques, B. P.; Corvol, P. Novel derivatives of 4,4'-dithiobis-(3-aminobutane-1-sulfphonates) and compositions containing same. 2006.
109. HORMANN, R. E.; POTTER, D. W.; CHORTYK, O.; TICE, C. M.; CARLSON, G. R.; MEYER, A.; OPIE, T. R. Bioavailable diacylhydrazine ligands for modulating the expression of exogenous genes via an ecdysone receptor complex. 2006.
110. MASADA, S.; TERAU, Y.; MURATA, T. INDOLE DERIVATIVE. 2012.
111. Rueeger, H.; Lueoend, R.; Rogel, O.; Rondeau, J. M.; Möbitz, H.; Machauer, R.; Jacobson, L.; Staufenberg, M.; Desrayaud, S.; Neumann, U. Discovery of cyclic sulfone hydroxyethylamines as potent and selective β -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) inhibitors: structure-based design and in vivo reduction of amyloid β -peptides. *J Med Chem* **2012**, 55, 3364-86.
112. GRASSHOFF, J. M.; TAYLOR, L. D. Quinone methide photographic reagent precursors. 1976.
113. Sun, M.; Hu, J.; Song, X.; Wu, D.; Kong, L.; Sun, Y.; Wang, D.; Wang, Y.; Chen, N.; Liu, G. Coumarin derivatives protect against ischemic brain injury in rats. *Eur J Med Chem* **2013**, 67, 39-53.
114. Ma, T.; Liu, L.; Xue, H.; Li, L.; Han, C.; Wang, L.; Chen, Z.; Liu, G. Chemical Library and Structure–Activity Relationships of 11-Demethyl-12-oxo Calanolide A Analogues as Anti-HIV-1 Agents. **2008**.
115. Yao, T.; Yue, D.; Larock, R. C. An efficient synthesis of coumestrol and coumestans by iodocyclization and Pd-catalyzed intramolecular lactonization. *J Org Chem* **2005**, 70, 9985-9.
116. Egan, W. J.; Merz, K. M.; Baldwin, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J Med Chem* **2000**, 43, 3867-77.
117. Arup K. Ghose; Vellarkad N. Viswanadhan, a.; Wendoloski, J. J. Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods. **1998**.
118. Waring, M. J. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2010**.
119. Kim, D.; Wang, L.; Beconi, M.; Eiermann, G. J.; Fisher, M. H.; He, H.; Hickey, G. J.; Kowalchick, J. E.; Leiting, B.; Lyons, K.; Marsilio, F.; McCann, M. E.; Patel, R. A.; Petrov, A.; Scapin, G.; Patel, S. B.;

Bibliographie

- Roy, R. S.; Wu, J. K.; Wyvratt, M. J.; Zhang, B. B.; Zhu, L.; Thornberry, N. A.; Weber, A. E. (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem* **2005**, 48, 141-51.
120. McConnell, E. L.; Basit, A. W.; Murdan, S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J Pharm Pharmacol* **2008**, 60, 63-70.
121. Boegh, M.; Nielsen, H. M. Mucus as a barrier to drug delivery – understanding and mimicking the barrier properties. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2015**, 116, 179-86.
122. Debray, D.; Rainteau, D.; Barbu, V.; Rouahi, M.; El Mourabit, H.; Lerondel, S.; Rey, C.; Humbert, L.; Wendum, D.; Cottart, C. H.; Dawson, P.; Chignard, N.; Housset, C. Defects in gallbladder emptying and bile Acid homeostasis in mice with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficiencies. *Gastroenterology* **2012**, 142, 1581-91.e6.

Tables des illustrations

A. Figures

Figure 1 : Nombre de personnes atteintes du diabète, par région de la Fédération internationale du diabète ⁷	- 26 -
Figure 2 : Complications majeures du diabète ⁷	- 28 -
Figure 3 : Prévalence de l'obésité ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) dans le monde chez les sujets de plus de 20 ans, par sexe et par niveau de développement du pays.....	- 29 -
Figure 4 : Prévalence de l'obésité ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) dans le monde par sexe et par tranche d'âge.	- 30 -
Figure 5 : algorithme de traitement des patients atteints de diabète de type 2 ¹⁶	- 36 -
Figure 6 : Action pharmacologique directe des agonistes du récepteur au GLP-1 ²⁶	- 44 -
Figure 7 : voie de synthèse des principaux acides biliaires.....	- 47 -
Figure 8 : structure et polarité de l'acide cholique	- 48 -
Figure 9 : A : Activation de la production d'AMPC dans des cellules CHO exprimant TGR5. Les composés ont été testés à la concentration de $2 \mu\text{M}^3$	- 49 -
Figure 10 : Courbe dose-réponse de 5 acides biliaires sur le récepteur TGR5.	- 50 -
Figure 11 : Localisation d'une protéine de fusion TGR5-Green Fluorescent Protein exprimée par des cellules CHO ²	- 51 -
Figure 12 : Stimulation par des acides biliaires de la sécrétion de GLP-1 par des cellules GLUTag de manière TGR5-dépendante ²⁸	- 52 -
Figure 13 : Impact d'un inhibiteur de l'adénylyl cyclase sur la sécrétion de GLP-1 stimulée par le LCA ²⁸	- 53 -
Figure 14 : INT-777 entraîne une augmentation AMP-dépendante de la phosphorylation oxydative ⁵	- 54 -
Figure 15 : Effet de l'activation de TGR5 sur l'activité de la D2 et sur la consommation énergétique de HSMM ⁴	- 56 -
Figure 16 : Schéma général des différentes voies de signalisation décrites suite à l'activation du récepteur TRG5.	- 58 -
Figure 17 : Structure et caractérisation des composés GSK1 et GSK2. Sécrétion de GLP-1 après une dose intra-jéjunale (1mg/kg) coadministrée avec un challenge au glucose à t = 0min (0.125 g/kg) ⁵⁷	- 61 -
Figure 18 : Structure et caractérisation des agonistes de TGR5 RO1 RO2 et tauroRO2 ⁵⁸	- 62 -
Figure 19 : Structure et caractérisation de l'agoniste de TGR5 NOV1 ⁶⁰	- 64 -
Figure 20 : Structure et caractérisation des agonistes de TGR5 PF1 et PF2 ^{63, 64}	- 65 -
Figure 21 : Structure et caractérisation de l'agoniste de TGR5 SI1 ⁶⁵	- 66 -
Figure 22 : Etapes nécessaires à la distribution systémique d'un composé après administration per os, organes exposés à chaque étape, et solutions possibles pour empêcher cette distribution.	- 69 -
Figure 23 : Schéma des différents mécanismes impliqués dans la perméabilité intestinale ⁶⁸ ..	- 71 -

Figure 24 : relation entre le nombre de violation à la règle des 5 et les processus combinés et individuels ⁷⁰	- 72 -
Figure 25 : Structures d'anti-infectieux non absorbés par le tractus gastro-intestinal.	- 73 -
Figure 26 : Structure et caractérisation des agonistes de TGR5 SI2 et SI3 ⁷²	- 74 -
Figure 27 : Structure et caractérisation des agonistes de TGR5 SI4 et SI5 ⁷³	- 75 -
Figure 28 : Structure schématique d'un agoniste de TGR5 à visée topique intestinale et stratégie de développement.	- 77 -
Figure 29 : schéma du test cellulaire de transactivation utilisé lors du criblage à haut débit et pour les expériences de dose-réponse.	- 79 -
Figure 30 : Courbe théorique obtenue lors d'une expérience de dose-réponse et paramètres obtenus.....	- 80 -
Figure 31 : Structure des composés ayant servi de point de départ à l'optimisation du pharmacophore et activité sur les récepteurs TGR5 humain et murin.	- 81 -
Figure 32 : Conception des composés 7 et 8 par remplacement isostérique à partir des composés 1, 3, 3' et 3''.....	- 81 -
Figure 33 : Structure radiocristallographique du composé 8e' obtenu lors de la réaction de cyclodéshydratation du composé 8d.	- 85 -
Figure 34 : Structurer et activité des composés 3' et 3''.....	- 90 -
Figure 35 : Objectifs de l'exploration des relations structure-activité de la partie gauche des composés 8 et 8f.	- 90 -
Figure 36 : Changement du scaffold hétérocyclique central : passage du triazole (8) à l'imidazole (14).	- 93 -
Figure 37 : Structure du T3P®.....	- 95 -
Figure 38 : Relations structure-activité sur les récepteurs humain et murin au cours des changements de scaffold centraux (composé 3, 8 et 14).	- 95 -
Figure 39 : Structure radiocristallographique du composé 15.	- 96 -
Figure 40 : Positions cibles de la première série d'exploration des relations structure activité de la série des 5-amino-2-thioimidazoles.	- 100 -
Figure 41 : Positions cibles de la seconde série d'exploration des relations structure activité de la série des 5-amino-2-thioimidazoles.	- 106 -
Figure 42 : Tentative de synthèse des composés 40, 41 et 42 par la cyclodéshydratation au T3P®.....	- 106 -
Figure 43 : Représentation graphique de l'activité sur les récepteurs TGR5 humain et murin des composés obtenus lors de l'optimisation du pharmacophore.....	- 114 -
Figure 44 : Structure des kinétophores évalués au sein de ce projet.....	- 117 -
Figure 45 : Structure d'un composé basé sur le 14, portant un kinétophore.....	- 118 -
Figure 46 : Structure radiocristallographique du composé 48.	- 120 -
Figure 47 : Structures et activités sur le test primaire des composés 14, 48c et 48.	- 120 -
Figure 48 : Structure générale des composés portant un kinétophore, basés sur les composés 14 et 36.....	- 120 -
Figure 49 : Formule générale des dérivés mPEGylés.	- 122 -

Figure 50 : Exemple de l'analyse de la répartition des longueurs au sein d'un composé mPEGylé (le mPEG-Ts, $n_{\text{moyen}} = 16$)	124 -
Figure 51 : Comparaison de l'analyse RMN du composé 51 (en rouge) et du composé 52' (en bleu). Mise en évidence en particulier de la différence de déplacement chimique entre les protons et carbones des positions benzylique sur le cycle C (1) et en C4 de l'imidazole (2).	128 -
Figure 52 : Structure des composés 52, 53, 53 _{f1} , 53 _{f2} et 53 _{f3} et 54.	131 -
Figure 53 : linkers envisagés pour éloignés le mPEG du pharmacophore.	134 -
Figure 54 : Stimulation de la sécrétion de GLP-1 par des cellules entéroendocrines STC-1 en présence d'agonistes de TGR5.	135 -
Figure 55 : Configuration mise en place pour réaliser un test de perméabilité sur cellules Caco2.	138 -
Figure 56 : Représentation graphique de la perméabilité apparente (A vers B) et de la demi-vie microsomale des composés mPEGylés en fonction de la longueur de la chaîne mPEG.	142 -
Figure 57 : Résumé des caractéristiques du composé 48.	143 -
Figure 58 : Stimulation de la sécrétion de GLP-1 chez des souris C57Bl6 mâles par un bolus glucose (2g/kg) et par le composé 48 (3x20 mg/kg) administrés par voie orale.	144 -
Figure 59 : Stimulation de la sécrétion de GLP-1 chez des souris C57Bl6 mâles par le composé 48 administré par voie orale.	145 -
Figure 60 : Effet sur le volume de la vésicule biliaire de souris C57Bl6 mâles du composé 48 (3x20 mg/kg) administré par voie orale.	147 -
Figure 61 : Evaluation pharmacocinétique du composé 48 : volume de la vésicule biliaire et concentration plasmatique et biliaire du composé 48.	148 -
Figure 62 : Résumé des caractéristiques du composé 51.	149 -
Figure 63 : Stimulation de la sécrétion de GLP-1 chez des souris C57Bl6 mâles par le composé 51 (3x32 µmol/kg) administré par voie orale.	150 -
Figure 64 : Résumé des caractéristiques du composé 53.	151 -
Figure 65 : Effet sur le volume de la vésicule biliaire de souris C57Bl6 mâles renourries ou non du composé 53 (3x32 µmol/kg) administré par voie orale.	152 -
Figure 66 : Résumé des caractéristiques du composé 50.	152 -
Figure 67 : Effet du composé 50 (3x32 µmol/kg) administré par voie orale sur la sécrétion de GLP-1 (A.) et sur le volume de la vésicule biliaire (B.).	154 -
Figure 68 : Pharmacocinétique du composé 50 chez la souris C57Bl6 après administration du composé 50 par voie orale (32 µmol/kg).	156 -
Figure 69 : Effet du composé 50 (32 µmol/kg) administré par voie orale selon les protocoles n°2a (A., en bleu) et n°2b (A, en brun) sur la sécrétion de GLP-1 (B.).	158 -
Figure 70 : Effet du composé 50 (32 µmol/kg) administré par voie orale selon les protocoles n°2a et n°2b sur le volume de la vésicule biliaire.	159 -
Figure 71 : Effet du composé 50 administré par voie orale (t-8h, A.) sur la sécrétion de GLP-1 (B.) et sur le volume de la vésicule biliaire (C.)	160 -

B. Tableaux

Tableau 1 : Activité des composés 7 et 8 et de certains intermédiaires de synthèse.	- 89 -
Tableau 2 : Activités des analogues des composés 8 et 8f.	- 91 -
Tableau 3 : Optimisation des conditions de cyclodéshydratation du composé 15 en composé 16.	- 97 -
Tableau 4 : Exemplification de la réaction de cyclisation.	- 99 -
Tableau 5 : activité biologique des analogues du composé 14.	- 105 -
Tableau 6 : activité biologique de la deuxième série d'analogues du composé 14.	- 113 -
Tableau 7 : Activités des composés portant un kinétophore.	- 133 -
Tableau 8 : Solubilité, logD mesurés, et paramètres calculés par le logiciel Pipeline Pilot (cLogD, ALogP et PSA) du composé 14 et des composés portant un kinétophore.	- 137 -
Tableau 9 : Résultats des tests de perméabilité sur cellules Caco 2 réalisés sur certains composés portant un kinétophore.	- 139 -
Tableau 10 : Résultats des tests de stabilité microsomale des composés 14, 48, 50, 51 et 52 sur microsomes de souris mâles.	- 140 -

C. Schémas

Schéma 1 : Obtention des 3-amino-5-thio-[1,2,4]triazoles par cyclisation du motif carbamothioyl hydrazinecarboxamide	- 82 -
Schéma 2 : Obtention du composé 7c.	- 83 -
Schéma 3 : Cyclisation du composé 7c.	- 83 -
Schéma 4 : Obtention du composé 8d. Le composé 8 ^e n'a pas pu être obtenu.	- 84 -
Schéma 5 : Cycodeshydratation du composé 8d en présence de POCl ₃ et produits possibles. .	- 85 -
Schéma 6 : Obtention du composé 7f.	- 86 -
Schéma 7 : Schéma général de la réaction de Chan-Lam-Evans.	- 86 -
Schéma 8 : Réaction de Chan-Lam-Evans sur le composé 7f.	- 87 -
Schéma 9 : Obtention du composé 7i par réaction de Chan-Lam-Evans.	- 87 -
Schéma 10 : Désacétylation du composé 7i.	- 88 -
Schéma 11 : Obtention du composé 8 à partir du composé 7f par méthylation puis couplage de Chan-Lam-Evans.	- 88 -
Schéma 12 : Synthèses décrites de motifs 5-amino-2-thioimidazoles.	- 93 -
Schéma 13 : Voie de synthèse envisagée pour l'obtention du composé 14.	- 94 -
Schéma 14 : mécanisme proposé pour l'obtention du composé 16 et de l'impureté 16'... -	- 97 -
Schéma 15 : voie de synthèse générale n°1 des 5-amino-2-thioimidazoles.	- 101 -
Schéma 16 : Synthèse de la thiourée dissymétrique 47d.	- 102 -
Schéma 17 : Analyses rétrosynthétiques permettant d'aboutir aux composés 41 et 42.. -	- 107 -
Schéma 18 : Synthèse du composé 43 selon la voie de synthèse n°1 et tentative de déprotection pour obtenir le composé 44.	- 108 -

Schéma 19 : Synthèses décrites pour 3-amino-5-thio[1,2,4]triazoles (A) et les 3-aminopyrazoles (C), et tentatives d'application aux 5-amino-2-thioimidazoles (B et D).	- 108 -
Schéma 20 : acylation et alkylation de l'azote extracyclique du composé 44.	- 109 -
Schéma 21 : Modification de l'analyse rétrosynthétique de l'acétamidoisothiourée. La séquence du haut (analyse n°1bis, A) correspond à la nouvelle analyse envisagée. La séquence du bas (B) correspond à l'analyse ayant conduit à la voie de synthèse n°1.	- 109 -
Schéma 22 : Synthèse du composé 43 selon l'analyse rétrosynthétique n°1bis.	- 110 -
Schéma 23 : Synthèse du composé 44 par la voie de synthèse n°1 à partir de la N-allyl-3,4-diméthoxyaniline.	- 110 -
Schéma 24 : tentative de déprotection du composé 46 en composé 41.	- 111 -
Schéma 25 : Synthèse du composé 47 selon la voie de synthèse n°1.	- 112 -
Schéma 26 : Synthèse du composé 48.	- 119 -
Schéma 27 : Chloration de l'alcool 4-bromo-2,6-difluorobenzyle, et synthèse du composé 48b selon la voie de synthèse n°1.	- 119 -
Schéma 28 : Synthèse des composés 49 et 50 selon une voie de synthèse dérivée de la voie de synthèse n°1.	- 121 -
Schéma 29 : Synthèse de l'intermédiaire i1.	- 122 -
Schéma 30 : Synthèse de l'intermédiaire i2.	- 125 -
Schéma 31 : Synthèse du composé 51 à partir des composés 14c et i2 via la voie de synthèse n°1.	- 125 -
Schéma 32 : synthèse envisagée pour l'obtention des composés porteurs d'un groupement mPEG de longueur de chaîne n à partir de l'intermédiaire i3.	- 126 -
Schéma 33 : obtention de l'intermédiaire i3 en une étape à partir de l'intermédiaire i1a.	- 126 -
-	
Schéma 34 : Obtention de l'intermédiaire i3b selon la voie de synthèse n°1 à partir du composé 14c et de l'intermédiaire i3.	- 127 -
Schéma 35 : Obtention du composé 52' à partir du composé i4b.	- 127 -
Schéma 36 : Mécanisme proposé pour expliquer l'isomérisation observée lors de l'obtention du composé i3 en milieu basique.	- 129 -
Schéma 37 : Synthèse de l'intermédiaire i5 par ditosylation de l'intermédiaire i1a.	- 129 -
Schéma 38 : Synthèse du composé i3d selon la voie de synthèse n°1 à partir des composés 14c et i5.	- 130 -
Schéma 39 : Tentative de déprotection du groupement Tosyle par le TBAF et produits obtenus.	- 130 -

VI. Partie expérimentale

A. Chemistry

1. General Information

a) Synthesis

Microwave-assisted chemical reactions were conducted on a CEM Discover™ synthesis system or a Biotage® Initiator+ microwave synthesizer. Progress of all reactions was routinely monitored by thin layer chromatography (TLC) and/or by High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrum (HPLC-MS). TLC was performed using Merck commercial aluminum sheets coated with silica gel 60 F₂₅₄. Visualization was achieved by fluorescence quenching under UV light at 254 nm, and stained by one of the following reagents: solution of CuCl₂ in MeOH, ninhydrin solution or iodine.

b) Analysis

HPLC-MS analysis was performed on two different HPLC-MS system:

1. LC-MS Waters Alliance Micromass ZQ 2000 system was equipped with a Waters 2747 sample manager, a Waters 2695 separations module, a Waters 2996 photodiode array detector (200-800nm) and a Waters Micromass ZQ2000 detector (scan 100-800).
2. LC-MS Waters 3100 Mass Detectors system was equipped with a Waters 2767 sample manager, a Waters 515 HPLC pump, a Waters Systems Fluidics Organizer, a Waters 2545 Binary Gradient Module, a Waters 2487 Dual λ Absorbance (215nm and 254nm) detector and a Waters 3100 Mass detectors.

XBridge C18 column (3.5 μ m particle size, dimensions 50mm x 4.6mm) was used for HPLC analysis. The injection volume is 20 μ L. A mixture of water and acetonitrile was used as mobile phase in gradient-elution. pH of mobile phase was adjusted with HCOOH and NH₄OH to form a buffer solution at pH 3.8 or pH 9.2 depend on the ratio of these components. The analysis time is 5 minutes (at a flow rate at 2 mL/min) or 10 minutes (at a flow rate at 1 mL/min). Purity (%) was determined by reversed phase HPLC, using UV detection (215 nm), and all isolated compounds showed purity greater than 95%. All commercial reagents and solvents were used without further purification.

HRMS analysis was performed on a LCT Premier XE Micromass, using a C18 X-Bridge 3.5 μ m particle size column, dimensions 50 mm * 4.6 mm. A gradient starting from 98% H₂O 5 mM Ammonium Formate pH=9.2 and reaching 100% CH₃CN 5 mM Ammonium Formate pH=9.2 within 3 min at a flow rate of 1 mL/min was used.

NMR spectra were recorded on a Bruker DRX-300 spectrometer. Chemical shifts are in parts per million (ppm). The assignments were made using one-dimensional (1D) ¹H and ¹³C spectra and two-dimensional (2D) HSQC, HMBC and COSY spectra.

Abbreviations:

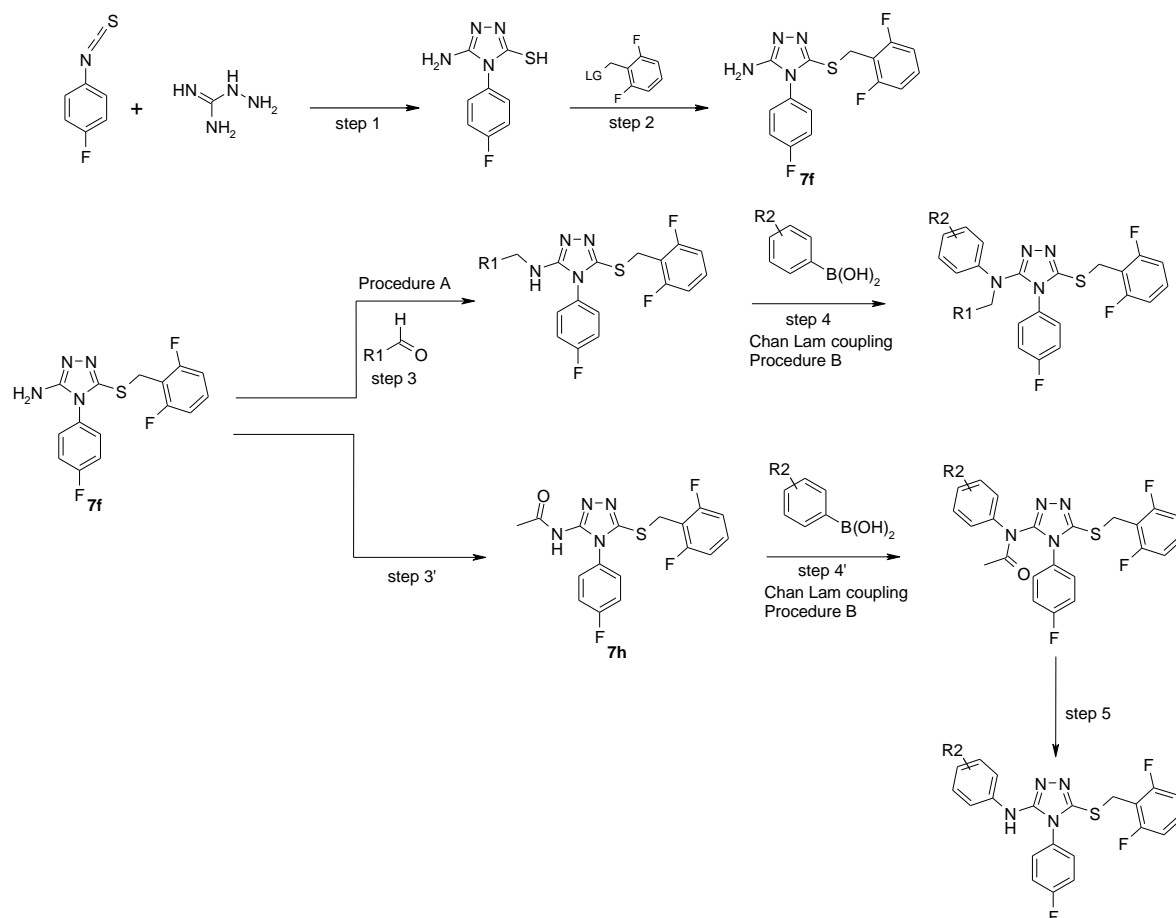
s	Singlet	sex	sextet
brs	Broad singlet	sep	septet
d	doublet	m	multiplet
t	triplet	δ	Chemical shift
q	quartet	J	Coupling constant
quin	quintet		

c) Purification

Purification was conducted by several methods: recrystallization, flash chromatography or preparative HPLC. Flash column chromatography was performed on prepacked columns: AIT Chromato (40-60 μ m) or puriFlash[®] Dry Load Silica columns (Interchim[®]) or Reveleris[®] flash cartridges (20–40 μ m, Grace[®]) under pressure by a Flashmart[™] pump. Preparative HPLC were performed using one of these two systems. The first is a Varian ProStar system using an Omnisphere 10 C₁₈ column (250 mm x 41.4 mm) Dynamax from Varian, Inc. A gradient starting from CH₃CN-H₂O and formic acid (20-80-0.1%) and reaching 100%CH₃CN/0.1% formic acid at a flow rate of 80 mL/minutes (min) was used. Products were detected by UV absorption at 215 nm and/or 254 nm. The second is Waters-2 system using a XBridge[™] Prep C18 5 μ m OBD[™], dimensions 50 mm x 250 mm column. Mobile phase is a gradient mixture of CH₃CN and water in ammonium formate buffer at pH 9.2 or pH 3.8. Flow rate at 80mL/min was used. Products were detected by UV absorption and/or by MS.

2. 5-amino-3-thio-[1,2,4]triazoles

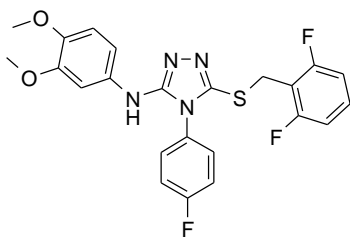
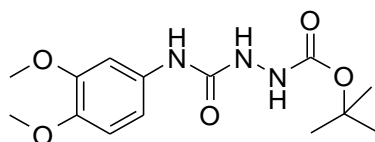
General route toward 5-amino-3-thio-[1,2,4]triazole derivatives.

**Procedure A**

A suspension of 5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-ylamine **7f** (1 eq.) and sodium methanolate (5 eq.) in methanol (QS 0.5M) is added to the aldehyde (1,4 eq.). Reaction mixture is stirred at room temperature for 16 hours. $NaBH_4$ (1 eq.) is then added, and reaction mixture is stirred at reflux for 30 to 120 min. After cooling down to room temperature, reaction mixture is partially evaporated. KOH_{aq} 1M is then added. This solution is then extracted by EtOAc. Organic phase is dried over $MgSO_4$, and evaporated to dryness. Residue is purified by flash chromatography (DCM/MeOH).

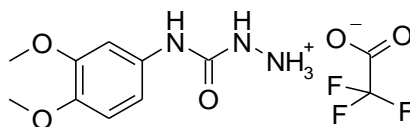
Procedure B

The 5-amino-3thio-[1,2,4]triazolyl-amine derivative (1 eq) and the phenylboronic acid derivative (1eq) are dissolved in dichloromethane (QS 20 mM). Molecular sieve 4 \AA , pyridine (2 eq) and copper^(III) acetate ($Cu(OAc)_2$) (1.5 eq) are added to the solution. Reaction mixture is stirred at room temperature for several hours. Pyridine, phenylboronic acid derivative, and $Cu(OAc)_2$ are added several time until satisfying conversion. Reaction mixture is then filtered on Celite. Filtrate is washed by water, and saturated $NaHCO_3_{aq}$. Organic phase is dried over $MgSO_4$, and evaporated to dryness. Residue is purified by flash chromatography (DCM/MeOH).

**Composé 7****2-(1,1-dimethylethoxycarbonyl)-N-(3,4-dimethoxyphenyl)hydrazinecarboxamide (7a)**

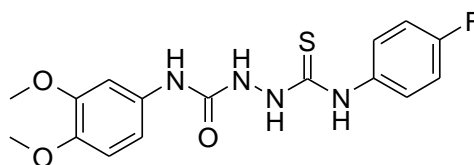
1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) (3.70 g, 22.85 mmol) and imidazole (67 mg, 0.98 mmol) were dissolved in 23 mL tetrahydrofuran (THF). The solution was then cooled down to -10°C . 3,4-dimethoxyaniline (1.01 g, 6.53 mmol) was dissolved in 65 mL THF and added dropwise in 1 h 30 in the CDI solution. After the addition, mixture is stirred at -10°C for 20 min. Tertbutylcarbazate (1.04 g, 7.83 mmol) was then added and reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour. Then, tertbutylcarbazate (435 mg, 3.29 mmol) was added again and reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Reaction mixture was then evaporated to dryness dissolved in 20 mL ethyl acetate (EtOAc) and washed with HCl_{aq} 0,1N and brine. Organic phase was then dried over MgSO_4 and evaporated to dryness to give a brown oil corresponding to the titled product. Yield is considered to be 100% in the next step.

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 312.0$

**4-(3,4-dimethoxyphenyl)semicarbazidium trifluoroacetate (7b)**

2-(1,1-dimethylethoxycarbonyl)-N-(3,4-dimethoxyphenyl)hydrazinecarboxamide (7a) (6.53 mmol) was dissolved in 10 mL dichloromethane (DCM) and 10 mL of trifluoroacetic acid were then gently added. Reaction mixture was then stirred at room temperature for 1 hour. Reaction mixture was then evaporated to dryness. The obtained residue was triturated in diethyl ether and the suspension was filtered to give a purple powder corresponding to the titled product. Yield is considered to be 100% in the next step.

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 212.0$

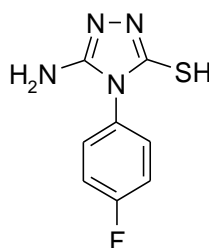


2[(4-fluorophenyl)carbamothioyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)hydrazinecarboxamide (**7c**)

4-fluorophenylisothiocyanate (1.20 g, 7.84 mmol) was dissolved in 22 mL ethanol. A solution of 4-(3,4-dimethoxyphenyl) semicarbazidium trifluoroacetate (**7b**) (2.12 g, 6.53 mmol) and triethylamine (TEA) (1.06 mL, 7.84 mmol) in 66 mL ethanol was then added dropwise and reaction mixture was stirred under reflux for 1 h. Reaction mixture was then stirred at room temperature overnight, and the obtained suspension was filtered to give a white powder, corresponding to the titled product (1.45 g, 60% yield over the 3 steps).

MS $[M+H]^+$ m/z = 364.9

^1H -RMN (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.69 (s, 3H) ; 3.71 (s, 3H) ; 6.85 (D, 1H, J = 8.7 Hz) ; 6.98 (Dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.1 Hz) ; 7.15 (t, 2H, J = 8.9 Hz) ; 7.21 (d, 1H, J = 2.2 Hz) ; 7.49 (DD, 2H, J = 8.9 Hz, J = 5.0 Hz) ; 8.17 (s, 1H) ; 8.66 (s, 1H) ; 9.48 (s, 1H) ; 9.83 (s, 1H).

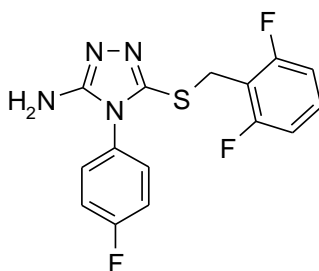


Step 1: 5-Amino-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazole-3-thiol (**7e**)

4-fluorophenylisothiocyanate (1.04 g, 6.54 mmol), aminoguanidinium chloride (1.45 g, 13.1 mmol), diisopropylethylamine (DIEA) (3.12 mL, 19.6 mmol) were dissolved in N,N-dimethylformamide (DMF) (9.40 mL). Reaction mixture was stirred at 50°C for 15 h, then evaporated to dryness. 13 mL of NaOH_{aq} 2M were then added, and reaction mixture was stirred at 50 °C for 18 hours. Suspension was then filtered, and filtrate was neutralized by addition of d'HCl_{aq} 2M and filtrated. Both precipitates were pulled together, to give an orange powder corresponding to the titled product (1.2 g, 87%).

MS $[M+H]^+$ m/z = 210.9

^1H -RMN (DMSO- d_6) : δ (ppm) 5.96 (s, 2H) ; 7.38 (m, 4H) ; 12.80 (s, 1H)

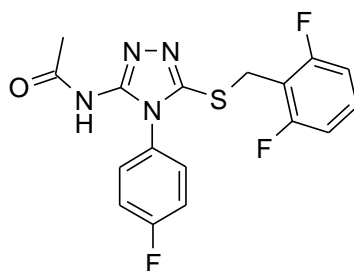


Step 2: 5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-ylamine (**7f**)

5-Amino-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazole-3-thiol (**7e**) (501 mg, 2.38 mmol), 2-bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (492 mg, 2.37 mmol), DIEA (416 μ L, 2.62 mmol) were dissolved in 12 mL dichloromethane. Reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours, then washed with water and brine, and organic phase was dried over MgSO_4 , and evaporated to dryness to give 787 mg of the expected product as a white powder (98%).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 336.9

^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$) : δ (ppm) 3.88 (s, 2H) ; 5.89 (s, 2H) ; 7.03 (t, 2H, J = 8.0Hz) ; 7.26-7.40 (m, 5H).



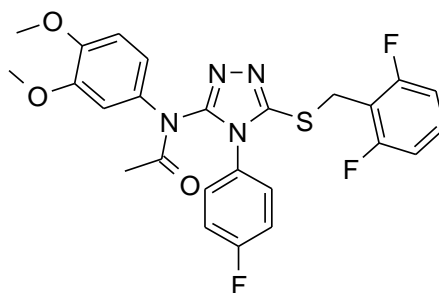
Step 3': N-[5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-yl]-acetamide (**7h**)

5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-ylamine (**7f**) (318 mg, 94.5 μ mol) was dissolved in 0.5 mL dichloromethane and acetic anhydride (450 μ L, 4.73 mmol) was then added. Reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. 5 mL of NaHCO_3 aq 2N were then added. Phases were separated, and organic phase was dried over MgSO_4 , and evaporated to dryness. Residue was recrystallized in isopropanol to give the titled product as white crystals (238 mg, 66%).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 378.9

^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$) : δ (ppm) 1.84 (s, 3H) ; 4.19 (s, 2H) ; 7.05 (t, 2H, J = 8.0Hz) ; 7.23-7.42 (m, 5H) ; 10.37 (brs, 1H).

Partie expérimentale

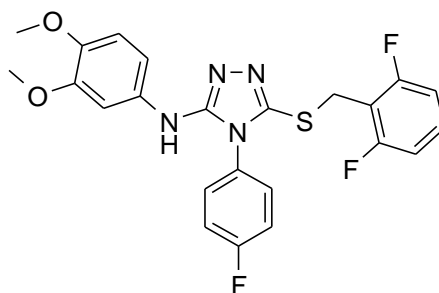


Step 4': *N*-[5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4*H*-[1,2,4]triazol-3-yl]-*N*-(3,4-dimethoxy-phenyl)-acetamide (**7i**)

The titled compound was obtained as a yellowish oil (420 mg, 50 %) following procedure B, using *N*-[5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4*H*-[1,2,4]triazol-3-yl]-acetamide (**7h**) (570 mg, 1.5 mmol), and 3,4-dimethoxyphenylboronic acid.

MS $[M+H]^+$ m/z = 514.9

^1H -RMN (DMSO- d_6) : δ (ppm) 1.65 (s, 3H) ; 3.79 (s, 3H) ; 3.81 (s, 3H) ; 4.31 (s, 2H) ; 7.05-7.18 (m, 3H) ; 7.24-7.54 (m, 7H).

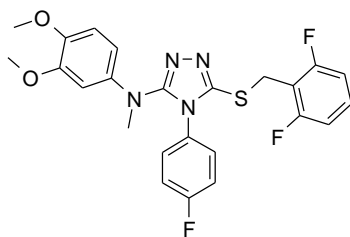
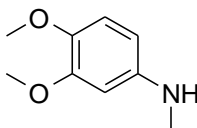


Step 5: 5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4*H*-[1,2,4]triazol-3-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-amine (**7**)

Acetyl chloride (2.4 mL) and ethanol (5mL) were gently mixed at 0-5°C, and the mixture was added to a solution of *N*-[5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4*H*-[1,2,4]triazol-3-yl]-*N*-(3,4-dimethoxy-phenyl)-acetamide (**7i**) (310 mg, 602 μmol) in 4.6 mL ethanol. Reaction mixture was then heated at 100°C for 30min. Reaction mixture was then evaporated, residue was dissolved in EtOAc, washed with water, and saturated NaHCO_3 aq. Organic phase is dried over MgSO_4 , and evaporated to dryness. Residue is recrystallized in isopropanol/méthanol to give 163.5 mg of the expected product as a white solid (57%).

MS $[M+H]^+$ m/z = 472.9

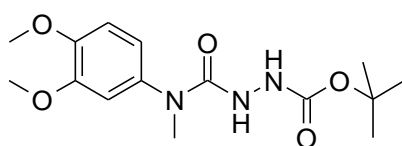
^1H -RMN (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.77 (s, 3H) ; 3.78 (s, 3H) ; 4.22 (s, 2H) ; 5.13 (brs, 1H) ; 7.00 (d, 1H, J = 8.8Hz) ; 7.35-7.55 (m, 7H).

**Composé 8****(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (8a)**

In a 250 mL flask were added 3g of 3,4-dimethoxyaniline and 5,29 g of sodium methoxide in 35 mL of methanol (dried over Na_2SO_4). Then, 1.18 g of paraformaldehyde and 15 mL of methanol (dried over Na_2SO_4) were added. Molecular sieve (4 Å) was then added and the mixture was stirred overnight at room temperature. 0.74 g of sodium borohydride were then added, and the mixture was heated under reflux for 1 hour. The mixture was then evaporated, dissolved in ethyl acetate and water, the two phases were separated. The aqueous phase was then basified by addition of saturated NaHCO_3 aq, and extracted by ethyl acetate. The organic phases were washed by saturated NaHCO_3 aq, brine, dried over Na_2SO_4 and evaporated, to give the titled product as an oily residue (2.67 g, 77 %), which was used without further purification in the next step.

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 168.0

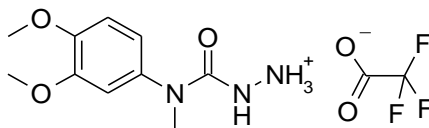
^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) : δ (ppm) 2.62 (d, 3H, J = 5.0Hz) ; 3.61 (s, 3H) ; 3.69 (s, 3H) ; 5.20 (q, 1H, J = 4.9Hz) ; 5.99 (Dd, 1H, J = 8.5Hz, J = 2.5Hz) ; 6.22, (d, 1H, J = 2.5Hz) ; 6.71 (d, 1H, J = 8.5Hz).

**2-(1,1dimethylethoxycarbonyl)-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-hydrazinecarboxamide (8b)**

CDI (58.6 mg, 359 μmol) is dissolved in 1.44 mL of dioxane. Tertiobutylcarbazate (40.2 mg, 299 μmol) was dissolved in 1.50 mL dioxane, and this solution was added dropwise to the CDI solution. Reaction mixture was then stirred at room temperature for 3 h. Then (3,4-Dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**8a**) (50.4 mg, 299 μmol) and TEA (42 μL , 299 μmol) were added and reaction mixture was stirred at 60°C overnight. Reaction mixture was then evaporated to dryness, dissolved in EtOAc, organic phase was washed with water, HCl_{aq} 0.1N, dried over MgSO_4 and evaporated to dryness to give the titled product as an orange solid (90 mg, 93%).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 325.97

^1H -RMN (DMSO- d_6) : δ (ppm) 1.38 (s, 9H) ; 3.11 (s, 3H) ; 3.74 (s, 3H) ; 3.74 (s, 3H) ; 6.78 (Dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.0$ Hz) ; 6.87 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz) ; 6.94 (D, 1H, $J = 8.5$ Hz) ; 7.61 (s, 1H) ; 8.42 (s, 1H).

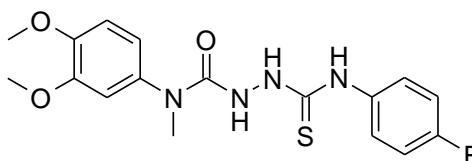


4-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-semicarbazidium trifluoroacétate (**8c**)

2-(1,1dimethylethoxycarbonyl)-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-hydrazinecarboxamide (**8b**) (925 mg, 2.84 mmol) was dissolved in 2 mL DCM. Then 2 mL trifluoroacetic acid were gently added and reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then reaction mixture was extracted with water. The aqueous phase was then evaporated and the residu was triturated in dichloromethane, and filtered to give the titled product as an orange solid (724.9 mg, 75%).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 225.95$

^1H -RMN (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.17 (s, 3H) ; 3.75 (s, 3H) ; 3.77 (s, 3H) ; 6.82 (Dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, 2.4 Hz) ; 6.90 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz) ; 7.00 (D, 1H, $J = 8.5$ Hz) ; 8.64 (s, 1H) ; 9.64 (Brs, 3H).

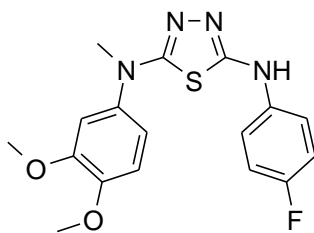


2[(4-fluorophenyl)-carbamothioyl]-N-(3,4dimethoxyphenyl)-N-méthyl-hydrazinecarboxamide (**8d**)

4-fluorophenylisothiocyanate (377 mg, 2.46 mmol) was dissolved in 6 mL ethanol. Le 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-semicarbazidium trifluoroacétate (**8c**) (696 mg, 2.05 mmol) and TEA (332 μL , 2.46 mmol) were dissolved in 27 mL ethanol. This solution was added dropwise to the isothiocyanate solution at room temperature. Then, reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Reaction mixture is then evaporated to dryness and residu is purified by flash chromatography (Cyclohexane / EtOAc) to give the titled product as a yellowish solid (600mg, 77%).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 378.86$

^1H -RMN (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.18 (s, 3H) ; 3.75 (s, 6H) ; 6.90 (Dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.2$ Hz) ; 6.95 (D, 1H, $J = 8.5$ Hz) ; 7.09 (d, 1H, $J = 2$ Hz) ; 7.15 (t, 1H, $J = 8.9$ Hz) ; 7.46 (DD, 1H, $J = 8.8$ Hz, $J = 5.1$ Hz) ; 8.20 (brs, 1H) ; 9.32 (s, 1H) ; 9.42 (brs, 1H).

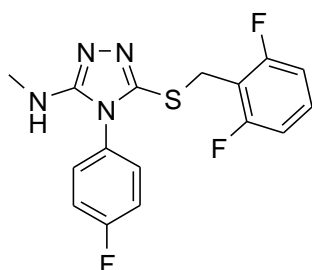


N-(3,4-Diméthoxy-phényl)-*N'*-(4-fluoro-phényl)-*N*-méthyl-[1,3,4]thiadiazole-2,5-diamine (**8e'**)

2[(4-fluorophenyl)-carbamoithioyl]-*N*-(3,4dimethoxyphenyl)-*N*-méthyl-hydrazinecarboxamide (**8d**) (431 mg, 1.14 mmol) was dissolved in 2.5 mL phosphoryl chloride (POCl₃), then reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. 10mL water were then added and mixture was then vigorously stirred at room temperature for 2 h. 10 mL EtOAc were then added and the mixture was stirred at room temperature overnight. Organic phase was then washed with water, with KOH_{aq} 0.1 M, dried over MgSO₄ and evaporated to dryness. Residue was recrystallized in a mixture of isopropanol/methanol to give the titled product as white cristals (153 mg, 37%).

MS [M+H]⁺ *m/z* = 360.9

¹H-RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 3.48 (s, 3H) ; 3.86 (s, 3H) ; 3.89 (s, 3H) ; 6.83-6.88 (m, 3H) ; 6.95 (t, 2H, *J* = 8.7 Hz) ; 7.26 (DD, 2H, *J* = 9.0 Hz, *J* = 4.4 Hz) ; 8.75 (brs, 1H).

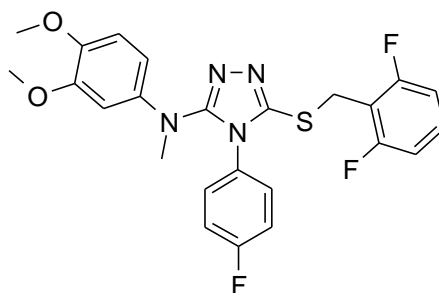


Step 3: [5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-yl]-methylamine (**8f**)

The titled compound was obtained as a yellowish solid (157 mg, 76%) following procedure A, using paraformaldehyde and 5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-ylamine (**7f**).

MS [M+H]⁺ *m/z* = 350.9

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) 2.73 (d, 3H, *J* = 4.8Hz) ; 3.91 (s, 2H) ; 5.82 (q, 1H, *J* = 4.7Hz) ; 7.04 (t, 2H, *J* = 8.0 Hz) ; 7.25-7.43 (m, 5H).

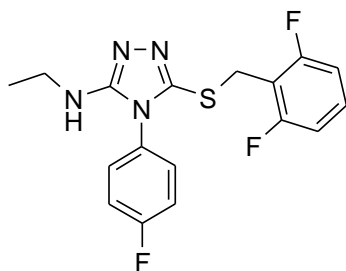


Step 4: [5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**8**)

The titled compound was obtained as a yellowish solid (42.4 mg, 11%) after purification by preparative HPLC, following procedure B using [[5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-yl]-methyl-amine (**8f**) (281 mg, 800 μmol) and 3,4-dimethoxyphenylboronic acid.

MS $[M+H]^+$ m/z = 486.9

^1H -RMN (CDCl_3) : δ (ppm) 2.69 (s, 3H) ; 3.92 (s, 3H) ; 3.95 (s, 3H) ; 4.26 (s, 2H) ; 6.84-6.94 (m, 3H) ; 7.10-7.42 (m, 7H)



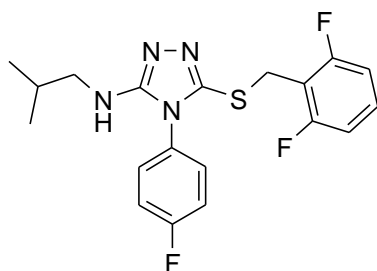
Composé 9

Step 3: [5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-yl]-ethyl-amine (**9**)

The titled compound was obtained as a yellowish solid (29 mg, 16%) following procedure A, using acetaldehyde and 5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-ylamine (**7f**) (167.2mg, 467 μmol).

MS $[M+H]^+$ m/z = 364.9

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) : δ (ppm) 1.08 (t, 3H, J = 7.1 Hz) ; 3.18 (qd, 2H, J = 7.1 Hz, J = 5.7 Hz) ; 3.91 (s, 2H) ; 5.83 (t, 1H, J = 5.7 Hz) ; 7.04 (m, 2H) ; 7.28-7.37 (m, 5H).

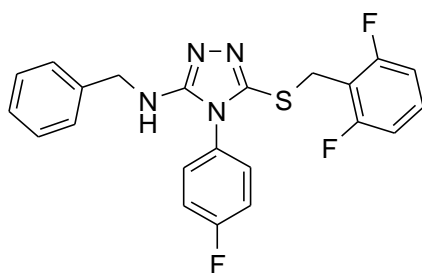
**Composé 10**

Step 3: [5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-yl]-isobutyl-amine (**10**)

The titled compound was obtained as a yellowish solid (73 mg, 37%) following procedure A, using isobutyraldehyde and 5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-ylamine (**7f**) (168,7 mg, 500 μ mol).

MS $[M+H]^+$ m/z = 392.9

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 0.82 (d, 6H, J = 6.8 Hz) ; 1.88 (nonuplet, 1H, J = 6.8 Hz) ; 2.96 (m, 2H) ; 3.90 (s, 2H) ; 5.91 (t, J = 5.8 Hz, 1H) ; 7.03 (m, 2H) ; 7.27-7.36 (m, 5H).

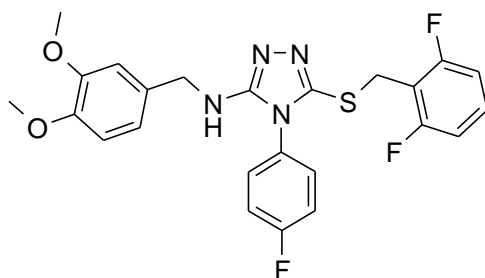
**Composé 11**

Step 3: Benzyl-[5-(2,6-difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-yl]-amine (**11**)

The titled compound was obtained as a white powder (149 mg, 70%) following procedure A, using benzaldehyde and 5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-ylamine (**7f**) (168,3 mg, 500 μ mol).

MS $[M+H]^+$ m/z = 426.9

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.91 (s, 2H) ; 4.37 (d, 2H, J = 6.1 Hz) ; 6.54 (t, 1H, J = 6.1 Hz) ; 7.03 (m, 2H) ; 7.18-7.36 (m, 10H).

**Composé 12**

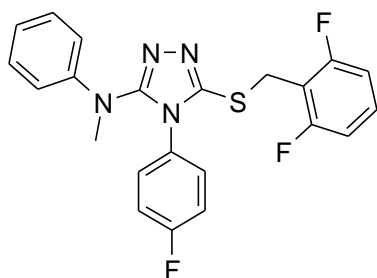
Step 3: [5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-yl]-(3,4-dimethoxy-benzyl)-amine (**12**)

The titled compound was obtained as a yellowish powder (38 mg, 26%) following procedure A, using 3,4-dimethoxy-benzaldehyde and 5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-ylamine (**7f**) (101 mg, 300 μ mol).

MS $[M+H]^+$ m/z = 486.9

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.71-3.72 (m, 6H) ; 3.91 (s, 2H) ; 4.28 (d, 2H, J = 6.0 Hz) ; 6.43 (t, 1H, J = 6.1 Hz) ; 6.81 (dd, 1H, J = 8.2 Hz, J = 1.6 Hz) ; 6.86 (d, 1H, J = 8.2 Hz) ; 6.92 (d, 1H, J = 1.5 Hz) ; 7.02 (m, 2H) ; 7.30-7.34 (m, 5H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 26.0 ; 46.0 ; 55.9 ; 56.0 ; 111.9 ; 112.1 ; 112.2 ; 113.1 (t, J = 19.4 Hz) ; 117.2 (d, J = 22.6 Hz) ; 119.9 ; 129.3 ; 130.6 ; 130.7 ; 132.8 ; 142.3 ; 148.2 ; 149.0 ; 156.8 ; 161.0 (dd, J = 248.3 Hz, J = 7.8 Hz) ; 162.7 (d, J = 246.7 Hz).

**Composé 13**

Step 3: [5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-yl]-methyl-phenyl-amine (**13**)

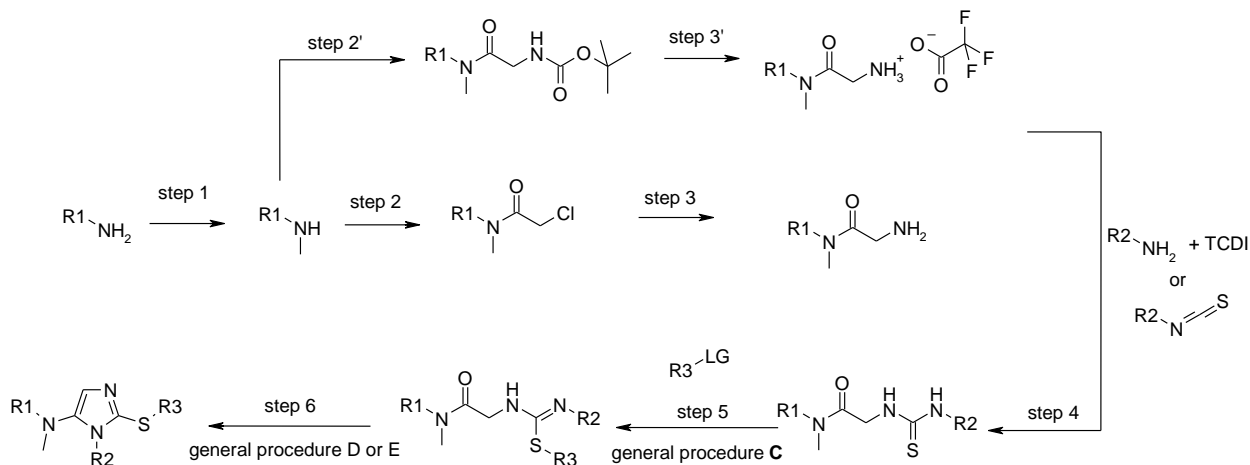
The titled compound was obtained as a yellowish solid (46 mg, 13%) after purification by preparative HPLC, following procedure B using [[5-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-4-(4-fluoro-phenyl)-4H-[1,2,4]triazol-3-yl]-methyl-amine (**8f**) (281 mg, 800 μ mol) and phenylboronic acid.

MS $[M+H]^+$ m/z = 426.9

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.16 (s, 3H) ; 3.69-3.76 (m, 8H) ; 4.19 (s, 2H) ; 6.61 (m, 2H) ; 6.79-6.89 (m, 2H) ; 6.95-7.00 (m, 4H) ; 7.05-7.13 (m, 3H) ; 7.38 (m, 1H).

3. 5-amino-2-thio-imidazoles

General route toward 5-amino-2-thio-imidazole derivatives.



Procedure C

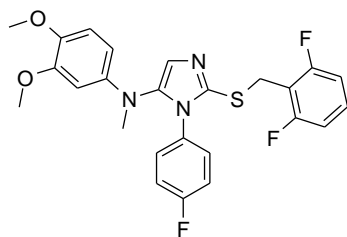
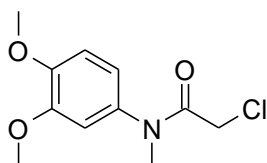
In a round bottom flask is added the isothioureido-derivative (1 eq), Potassium Carbonate (1 eq), sodium Iodide (0.5 eq), and acetonitrile (QS 0.2M). The suspension is stirred at room temperature for 10 min, benzyl halide (1eq) is then added. The suspension is stirred at room temperature overnight. Reaction mixture is then evaporated; residue is dissolved in EtOAc, washed with water and brine. Organic phase is dried over Na_2SO_4 and evaporated. Residue is purified by flash chromatography (cHex/EtOAc).

Procedure D

In a round bottom flask are introduced the isothioureido-acetamide derivative (1 eq), ethyl acetate (QS 0.1M), diisopropylethylamine (6 eq), and T3P® (3 eq). Reaction mixture is heated at reflux for 24h. After several hours, diisopropylethylamine, and T3P® are added several times, until completion. Reaction mixture is then diluted in EtOAc, washed by saturated $NaHCO_3$ aq, and brine. Organic phase is dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness. Residue is purified by flash chromatography (cHex/EtOAc).

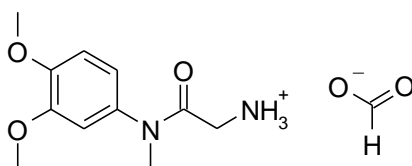
Procedure E

In a microwave tube are introduced the isothioureido-acetamide derivative (1 eq), ethyl acetate (QS 0.1M), diisopropylethylamine (6 eq), and T3P® (3 eq). Reaction mixture is heated under microwave irradiation at $150^\circ C$ for 10 min. Reaction mixture is then diluted with EtOAc, washed by saturated $NaHCO_3$ aq, and brine. Organic phase is then dried over Na_2SO_4 and evaporated. Residue is purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc).

**Composé 14****Step 2: 2-Chloro-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (14a)**

In a 250mL flask were introduced a solution of 2.67g of ((3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**8a**) and 7,9 mL of DIEA in 45 mL of DCM (dried over Na₂SO₄). The solution was stirred at 0°C. Then, a solution of 2.4mL of chloroacetyl chloride in 30 mL of DCM (dried over Na₂SO₄) was added dropwise in the flask. The mixture was then evaporated to dryness to give a brown residue which was used without further purification in the next step.

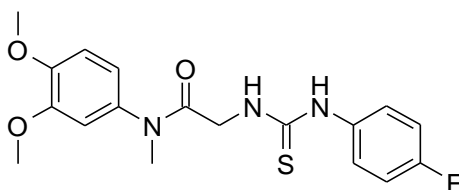
MS [M+H]⁺ *m/z* = 244.1

**Step 3: [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]ammonium formate (14b)**

Residue corresponding to 2-Chloro-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**14a**) obtained was dissolved in 25 mL of Ethanol 95°, and added dropwise in a 500 mL flask containing 320 mL of aqueous ammonia at 65°C. Reaction mixture was then evaporated to dryness. Residue was dissolved in DCM, and extracted several times by an aqueous solution of HCOOH 1M. Aqueous phase was then evaporated to dryness, and the residue was triturated in acetonitrile. The supernatant was evaporated to dryness, to give the titled product as a brown powder (3.82 g, 75 % yield over the 2 steps).

MS [M+H]⁺ *m/z* = 225.1

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) 3.17 (s, 3H) ; 3.76-3.77 (m, 6 H) ; 3.99 (s, 2H) ; 6.90 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.2 Hz) ; 6.99-7.03 (m, 2H) ; 8.00 (brs, 3 H) ; 8.20 (s, 1H)

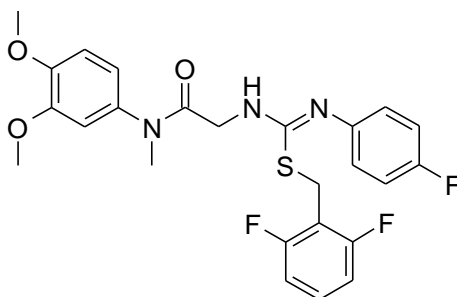


Step 4: N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**)

1.5 g of 4-fluorophenylisothiocyanate and 1.59 mL of TEA were added in a 250 mL flask in 15 mL Ethanol. 3.2 g of [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]ammonium formate (**14b**) were dissolved in 115 mL of ethanol, 1.33 mL of TEA were added, and the mixture was added dropwise at r.t. After the addition, the reaction was over. Reaction mixture was evaporated to dryness, and purified by flash chromatography (cHex/EtOAc), to give the titled product as a yellowish powder (2.8 g , 76 %).

MS $[M-H]^-$ m/z = 244.1

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 2.49 (s, 3H) ; 3.78 (m, 6H) ; 4.00 (d, 2H, J = 4.1 Hz) ; 6.92 (Dd, 1H, J = 8.4 Hz, J = 1.8 Hz) ; 7.01-7.03 (m, 2H) ; 7.15 (m, 2H) ; 7.45 (m, 2H) ; 7.73 (m, 1H) ; 9.90 (s, 1H)



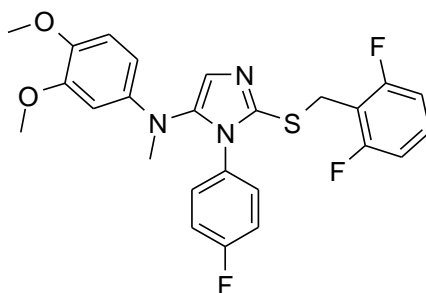
Step 5: 2-[2-(2,6-difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**14d**)

The titled product was obtained without purification as an oily residue (1.15 g, 91%), following Procedure C, using N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**) (940 mg) and 2-Bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (518 mg).

MS $[M+H]^+$ m/z = 504.0

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.16 (s, 3H) ; 3.69-3.76 (m, 8H) ; 4.19 (s, 2H) ; 6.61 (m, 2H) ; 6.79-6.89 (m, 2H) ; 6.95-7.00 (m, 4H) ; 7.05-7.13 (m, 3H) ; 7.38 (m, 1H)

Partie expérimentale

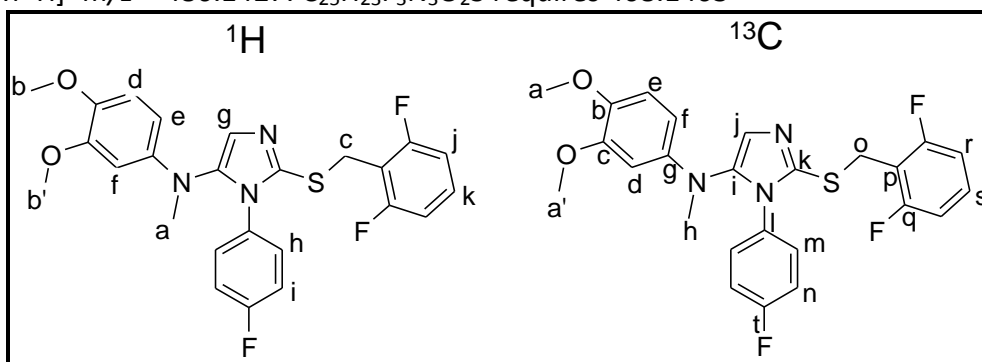


Step 6: [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**14**)

In a 50 mL flask were added 2-[2-(2,6-difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**14d**) (500mg), 10 mL EtOAc, TEA (843 μ L), and T3P® (1.77 mL). Reaction mixture was then stirred at reflux for 28 hours. After 8 hours, TEA (843 μ L) and T3P® (1.77mL) were added. After 25 hours, TEA (422 μ L) and T3P® (885 μ L) were added. After dilution with 20 mL EtOAc, the solution was washed by saturated NaHCO₃ aq, and brine. Organic phase was dried over Na₂SO₄ and evaporated. Residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH). The titled product was obtained as an oily residue (160 mg, 33%).

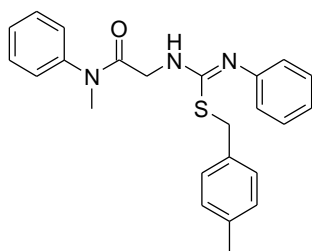
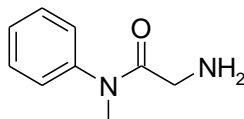
MS [M+H]⁺ m/z = 486.3

HRMS [M+H]⁺ m/z = 486.1427. C₂₅H₂₃F₃N₃O₂S requires 468.1463



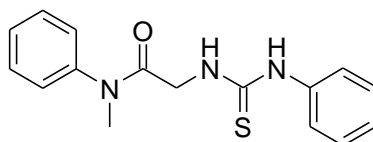
¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 2.92 (s, 3H, **a**) ; 3.80 (s, 3H, **b'**) ; 3.82 (s, 3H, **b**) ; 4.16 (s, 2H, **c**) ; 6.16 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, **e**) ; 6.30 (d, J = 2.7 Hz, 1H, **f**) ; 6.72 (d, J = 8.7 Hz, 1H, **d**) ; 6.78 (m, 2H, **j**) ; 6.83-6.85 (m, 4H, **h** & **i**) ; 6.92 (s, 1H, **g**) ; 7.19 (m, 1H, **k**).

¹³C-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 25.9 (**o**) ; 40.1 (**h**) ; 55.9 (**a'**) ; 56.4 (**a**) ; 99.9 (**d**) ; 105.5 (**f**) ; 111.2 (m, **r**) ; 112.4 (**e**) ; 113.6 (t, J = 19.3 Hz, **p**) ; 115.9 (d, J = 22.9 Hz, **n**) ; 124.4 (**j**) ; 129.1-129.2 (m, **m** & **s**) ; 130.8 (**l**) ; 138.1 (**k**) ; 139.6 (**i**) ; 142.7 (**g**) ; 143.2 (**b**) ; 149.6 (**c**) ; 161.1 (dd, J = 250.0 Hz, J = 7.7 Hz, **q**) ; 162.2 (d, J = 249.0 Hz, **t**).

**Composé 15****Step 2 and 3: 2-amino-N-methyl-N-phenylacetamide (15b)**

A solution of N-methylaniline (20 mmol, 2 mL) and DIEA (60 mmol, 10 mL) in dry DCM (0.2 M, 50 mL) was stirring at 0°C. Then a solution of chloroacetyl chloride (40 mmol, 3 mL) in dry DCM (0.2 M, 50 mL) was added dropwise. When the reaction was over, the mixture was evaporated to dryness to give the desired 2-chloro-N-methyl-N-phenylacetamide (**15a**). A solution of 2-chloro-N-methyl-N-phenylacetamide (20 mmol, 3.673 g) in ethanol 95° (0.6M, 33 mL) was added dropwise to a solution of aqueous ammonia 30% (21.8 mol, 412 mL), stirring at 65°C. Afterwards, the mixture was evaporated to dryness. The dry residue was dissolved in distilled water (The pH must be over 10, if not, some NaOH was added) and extracted with DCM. The organic phase was dried over sodium sulphate, filtered and evaporated to dryness to obtain 2-amino-N-methyl-N-phenylacetamide (**15a**) which was used without further purification in the next step.

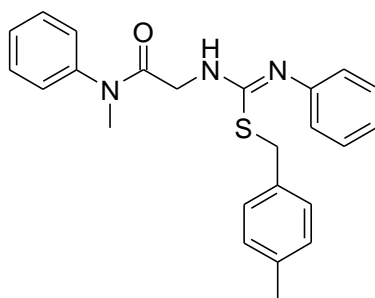
MS $[M+H]^+$ m/z = 165.0

**Step 4: N-methyl-N-phenyl-2-[(phenylcarbamothioyl)amino]acetamide (15c)**

2-amino-N-methyl-N-phenylacetamide (**15b**) (5.46 mmol, 897 mg) was dissolved in absolute ethanol (0.076M, 72 mL) and TEA (6.55 mmol, 884 μ L) was added. Phenyl isothiocyanate (5.46 mmol, 653 μ L) was added dropwise to this mixture at room temperature. After the addition, stirring was continued for 1 hour to complete the reaction. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate) to give the titled product (**15c**) as a white solid (350 mg, 21% yield).

MS $[M+H]^+$ m/z = 300.2

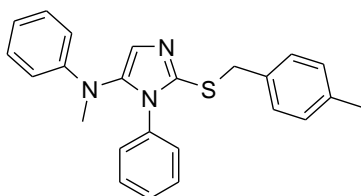
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.20 (s, 3H) ; 3.99 (s, 2H) ; 7.10 (t, 1H, J = 7.4 Hz) ; 7.26-7.36 (m, 2H) ; 7.37-7.54 (m, 7H) ; 7.76 (brs, 1H) ; 9.93 (s, 1H).



Step 5: N-Methyl-2-[2-(4-methyl-benzyl)-3-phenyl-isothioureido]-N-phenyl-acetamide (**15**)

N-methyl-N-phenyl-2-[(phenylcarbamothioyl)amino]acetamide (**15c**) (1.169 mmol, 350 mg), potassium carbonate (1.169 mmol, 161 mg) and sodium iodide (0.585 mmol, 87 mg) were added in a flask, containing acetonitrile (0.2M, 6 mL). The suspension was stirred at room temperature for 10 minutes and 1-bromomethyl-4-methylbenzene (1.169 mmol, 216 mg) was added. The suspension was stirred at room temperature for 18 hours. The medium was then evaporated, the residue dissolved in ethyl acetate and washed with water and brine. The aqueous phase was extracted by dichloromethane. The organic phases were dried over sodium sulphate and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc) to obtain the titled product (**15**) as a yellowish solid (267 mg, 56% yield). MS $[M+H]^+$ m/z = 404.2

^1H NMR (DMSO, d_6) δ (ppm) 2.42 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 3.73 (s, 2H), 4.07 (s, 2H), 6.55 (m, 1H, NH), 6.62 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 6.89 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.18-7.13 (m, 4H), 7.37-7.34 (m, 3H), 7.47-7.43 (m, 2H).



Composé 16

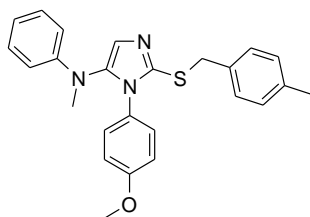
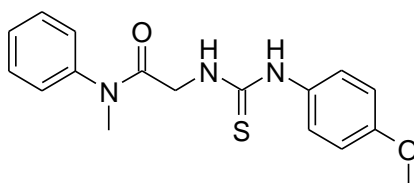
Step 6: Methyl-[2-(4-methyl-benzylsulfanyl)-3-phenyl-3H-imidazol-4-yl]-phenyl-amine (**16**)

The titled product was obtained as pale yellow oil (137 mg, 58%), following Procedure E, using N-Methyl-2-[2-(4-methyl-benzyl)-3-phenyl-isothioureido]-N-phenyl-acetamide (**15**) (250mg, 0.62 mmol).

MS $[M+H]^+$ m/z = 386.0

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm), 2.27 (s, 3H). ; 2.95 (s, 3H) ; 4.17 (s, 2H) ; 6.51 (d, $J=7.8$ Hz, 2H) ; 6.67 (t, $J=7.5$ Hz, 1H) ; 6.97-6.94 (m, 2H) ; 7.01 (s, 1H) ; 7.09 (t, 6H).

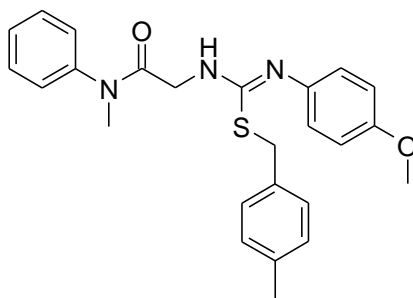
^{13}C NMR (CDCl_3) δ 21.2 ; 38.2 ; 39.4 ; 113.5 ; 118.5 ; 124.6 ; 127.4 ; 128.7 ; 128.9 ; 129.0 ; 129.2 ; 134.2 ; 134.9 ; 137.1 ; 138.2 ; 139.9 ; 148.4.

**Composé 17****Step 4:** 2-[3-(4-Methoxy-phenyl)-thioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**17c**)

In a 100 ml flask were added a solution of 421 μL (3.04 mmol) of 4-Methoxyphenyl isothiocyanate and 493 μL of TEA (3.65 mmol) in 2 mL of abs EtOH. 500 mg (3.045mmol) of 2-amino-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**15b**) were dissolved in 42 mL of EtOH and added dropwise at room temperature to the solution of isothiocyanate. After completion, ethanol was removed and the residue diluted in DCM and washed with HCl 1N solution and brine. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc) to give the titled compound as a white solid (871 mg, 86%)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 386.0$

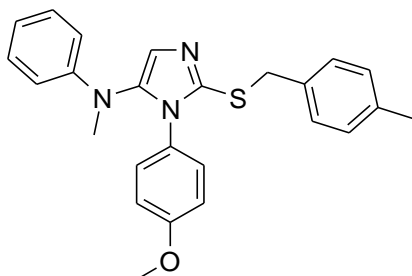
^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 9.69 (s, 1H), 7.49-7.46 (m, 3H), 7.40-7.38 (m, 3H), 7.25 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 2H), 6.89 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.19 (s, 3H).

**Step 5:** 2-[3-(4-Methoxy-phenyl)-2-(4-methyl-benzyl)-isothioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**17d**)

In a 25 mL flask were added 500 mg (1.51 mmol) of 2-[3-(4-Methoxy-phenyl)-thioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**17c**), 1-bromomethyl-4-methylbenzene (281 mg, 1.51 mmol), potassium carbonate (210 mg, 1.51 mmol) and sodium iodide (113 mg, 0.76 mmol) in 15 mL of acetonitrile (0.1 N). The suspension was stirred at room temperature. After 5 hours the reaction was complete. Solvent was evaporated. The crude product was dissolved in EtOAc and washed with water and brine to give orange oil. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc) to give the titled compound as colorless oil (280 mg, 43 %)

MS $[M+H]^+$ m/z = 434.0

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 7.47-7.34 (m, 5H), 7.17 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 6.73 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 6.54 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 6.44 (s, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.71 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 2.24 (s, 3H).



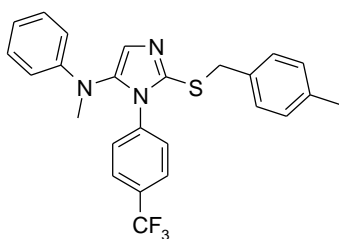
Step 6: [3-(4-Methoxy-phenyl)-2-(4-methyl-benzylsulfanyl)-3H-imidazol-4-yl]-methyl-phenyl-amine (**17**)

The titled product was obtained as colorless oil (171mg, 71 %), following Procedure E, using 2-[3-(4-Methoxy-phenyl)-2-(4-methyl-benzyl)-isothioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**17d**) (250mg, 0.56 mmol).

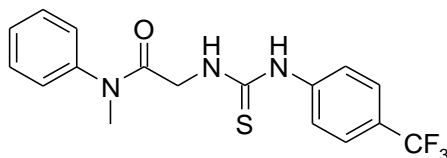
MS $[M+H]^+$ m/z = 416.0

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ 7.12-7.07 (m, 6H), 6.97 (s, 1H), 6.88 (d, $J=9.2$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J=9.2$ Hz, 2H), 6.67 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 4.16 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 2.27 (s, 3H)

^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 159.6, 148.9, 139.7, 138.6, 136.9, 135.1, 129.4, 129.2, 129.1, 127.5, 124.3, 118.4, 114.5, 113.2, 55.8, 40.04, 37.4, 21.2.



Composé 18



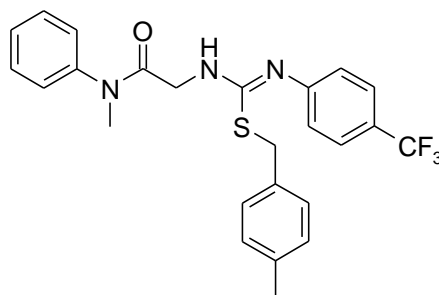
Step 4: N-Methyl-N-phenyl-2-[3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-thioureido]-acetamide (**18c**)

In a 100 ml flask were added a solution of 610 mg (3.0 mmol) of 4-trifluoromethylphenyl isothiocyanate and 486 μL (3.6 mmol) of TEA in 2 mL of abs EtOH. 492 mg (3.0 mmol) of 2-amino-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**15b**) are dissolved in 40 mL of EtOH and added dropwise at room temperature to the solution of isothiocyanate. After completion of the

reaction EtOH is evaporated. The titled product was engaged without further purification in the next step.

MS $[M+H]^+$ m/z = 368.0

^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm) 10.38 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.80 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.52-7.41 (m, 5H), 3.99 (s, 2H), 3.21 (s, 3H).

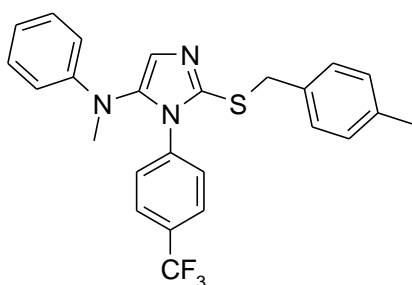


Step 5: N-Methyl-2-[2-(4-methyl-benzyl)-3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-isothioureido]-N-phenyl-acetamide (**18d**)

In a 100 mL flask were added 1102 mg (3.0 mmol) of N-Methyl-N-phenyl-2-[3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-thioureido]-acetamide (**18c**), 1-bromomethyl-4-methylbenzene (555 mg, 3.0 mmol), potassium carbonate (414 mg, 3 mmol) and sodium iodide (225 mg, 1.5 mmol) in 30 mL of acetonitrile (0.1 N). The suspension was stirred at room temperature and followed by LCMS. After 5 hours the reaction was complete. Solvent was evaporated. The crude product was dissolved in EtOAc and washed with water and brine. 1.4 gr of crude product was obtained and purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 95/5) to give the titled product as a white solid (1.08 g, 76 %).

MS $[M+H]^+$ m/z = 472.0

^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm) 7.50-7.42 (m, 4H), 7.37-7.33 (m, 3H), 7.17 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 6.92 (m, 1H), 6.77 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 4.11 (s, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.20 (s, 3H), 2.24 (s, 3H).



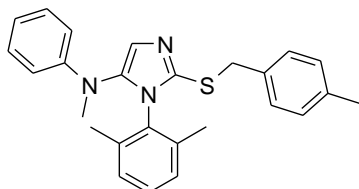
Step 6: Methyl-[2-(4-methyl-benzylsulfanyl)-3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-phenyl-amine (**18**)

The titled product was obtained as colorless oil (220 mg, 80 %), following Procedure E, using N-Methyl-2-[2-(4-methyl-benzyl)-3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-isothioureido]-N-phenyl-acetamide (**18d**) (282mg, 0.6 mmol).

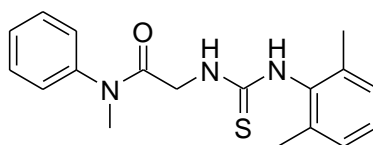
MS $[M+H]^+$ m/z = 454.0

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 7.67 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.12-7.02 (m, 7H), 6.68 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 4.15 (s, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.27 (s, 3H).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 148.5, 138.9, 138.6, 138.5, 137.0, 135.0, 130.0, 129.4, 129.3, 129.2, 128.8, 126.4 (q, $J=3.5$ Hz), 124.8, 124.2 (q, $J=272$ Hz), 118.8, 113.4, 40.2, 38.2, 21.1.

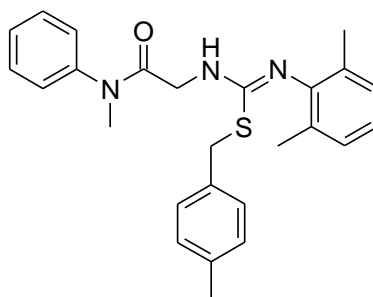


Composé 19



Step 4: 2-[3-(2,6-Dimethyl-phenyl)-thioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**19c**)

2,6-dimethylphenyl isothiocyanate (3 mmol, 451 μL), TEA (3.6 mmol, 486 μL) and absolute ethanol (0.08M, 2 mL) were introduced in a flask. 2-amino-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**15b**) (3 mmol, 492 mg) was dissolved in ethanol (35 mL) and added dropwise. After completion of the reaction, the solvent was removed under reduced pressure to afford the titled compound as a yellow solid, which was used in the next step without further purification.



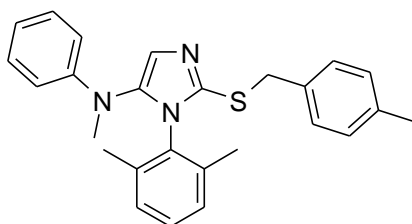
Step 5: 2-[3-(2,6-Dimethyl-phenyl)-2-(4-methyl-benzyl)-isothioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**19d**)

2-[3-(2,6-Dimethyl-phenyl)-thioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**19c**) (3 mmol, 982 mg), potassium carbonate (3 mmol, 414 mg) and sodium iodide (1.5 mmol, 224 mg) were added in a flask containing acetonitrile (0.2M, 15 mL). The suspension was stirred at room temperature for ten minutes and 1-bromomethyl-4-methylbenzene (3 mmol, 555 mg) was then added. The suspension was stirred at room temperature. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, the residue dissolved in ethyl acetate and washed with water and brine. The aqueous phase was extracted by dichloromethane. The organic

phases were dried over sodium sulphate and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 95/5) to obtain the titled compound as a white solid (810 mg, 62% yield).

MS $[M+H]^+$ m/z = 432.0

1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 7.46-7.36 (m, 3H), 7.27-7.20 (m, 4H), 7.11 (d, J =7.8 Hz, 2H), 6.95 (d, J =7.5 Hz, 2H), 6.83 (t, J =7.2 Hz, 1H) 4.11 (s, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.32 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.03 (s, 6H).



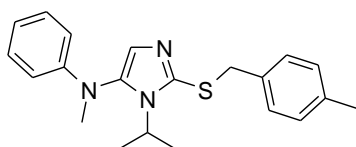
Step 6: [3-(2,6-Dimethyl-phenyl)-2-(4-methyl-benzylsulfanyl)-3H-imidazol-4-yl]-methyl-phenyl-amine (**19**)

The titled product was obtained as yellow oil (283 mg, 98%), following Procedure E, using 2-[3-(2,6-Dimethyl-phenyl)-2-(4-methyl-benzyl)-isothioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**19d**) (283 mg, 0.6 mmol).

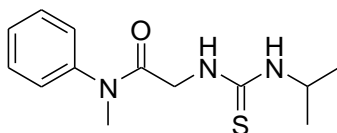
MS $[M+H]^+$ m/z = 414.0

1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 7.22-7.13 (m, 5H), 7.11 (s, 1H), 7.09-7.01 (m, 4H), 6.80 (t, J =6.6 Hz, 3H), 4.34 (s, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 1.89 (s, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 148.1, 140.4, 138.4, 137.1, 136.9, 134.0, 132.9, 129.2, 129.1, 129.0, 128.7, 128.4, 124.0, 119.3, 115.0, 39.6, 36.6, 21.1, 18.0.



Composé 20



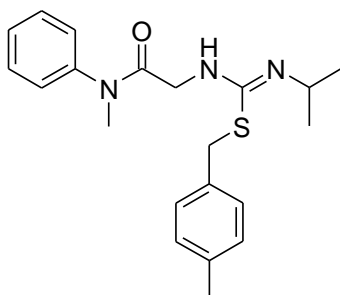
Step 4: 2-(3-Isopropyl-thioureido)-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**20c**)

In a 100 ml flask were added a solution of isobutyl isothiocyanate (324 μ L; 3.06 mmol) and TEA (496 μ L, 3.77 mmol) in 4 mL of abs EtOH. Formiate salt of 2-amino-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**15b**) (0.7 g) are dissolved in 46 mL of EtOH and added dropwise at room temperature to the solution of isothiocyanate. Then isopropylisothiocyanate (324 μ L; 3.06 mmol) was added twice in 1 hour, and 2 hours later, 65 μ L (0.2 eq) are also added. Reaction was considered to be over, and reaction mixture was then evaporated. A recrystallization

was performed using a mixture of isopropanol/methanol, to give the titled product as white crystals (168 mg, 21%).

MS $[M+H]^+$ m/z = 266.0

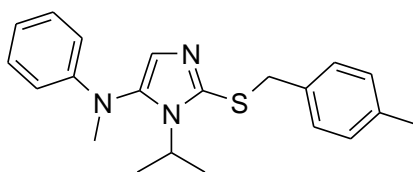
1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm) 1.17 (d, 6H, J = 6.5 Hz) ; 3.27 (s, 3H) ; 4.04 (s, 2H) ; 4.27 (brs, 1H) ; 7.37-7.53 (m, 5H).



Step 5: 2-[3-Isopropyl-2-(4-methyl-benzyl)-isothioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (20d)

2-(3-Isopropyl-thioureido)-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**20c**) (0.6 mmol, 150 mg) was dissolved in dry acetonitrile (0.15M, 0.5mL). Sodium iodide (0.28 mmol, 42 mg) was then added to this solution. A solution of 1-bromomethyl-4-methylbenzene (0.6 mmol, 105 mg) and DIEA (0.6 mmol, 97 μ L) in dry acetonitrile (3.5 mL) was then added dropwise in the flask. After completion, the mixture was diluted with ethyl acetate (60 mL) and washed with water (2x15 mL) and brine (30 mL). The organic phase was dried over sodium sulphate and evaporated. Residue was purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 7/3) to give the titled compound as a yellowish solid (112 mg, 50%).

MS $[M+H]^+$ m/z = 370.0



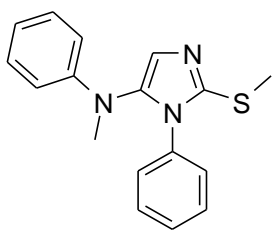
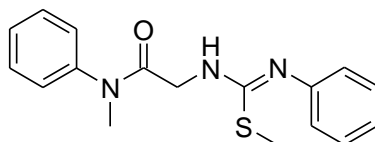
Step 6: [3-Isopropyl-2-(4-methyl-benzylsulfanyl)-3H-imidazol-4-yl]-methyl-phenyl-amine (20)

The titled product was obtained as yellowish solid (46 mg, 51 % yield), following Procedure E, using 2-[3-Isopropyl-2-(4-methyl-benzyl)-isothioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**20d**) (95 mg, 0.26 mmol).

MS $[M+H]^+$ m/z = 352.1

1H NMR (DMSO- d_6) : δ (ppm) 1.12 (d, J = 7.0 Hz, 6H) ; 2.26 (s, 3H) ; 3.12 (s, 3H) ; 4.09 (sep, J = 7.0 Hz, 1H) ; 4.26 (s, 2H) ; 6.52 (m, 2H) ; 6.74 (m, 1H) ; 6.85 (s, 1H) ; 7.08-7.20 (m, 6H).

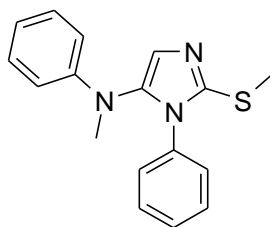
^{13}C NMR (DMSO- d_6) : δ (ppm) 21.2 ; 21.6 ; 38.5 ; 40.7 ; 47.0 ; 113.4 ; 118.5 ; 124.6 ; 129.3 ; 129.4 ; 135.3 ; 136.8 ; 137.3 ; 149.2.

**Composé 21****Step 5: N-Methyl-2-(2-methyl-3-phenyl-isothioureido)-N-phenyl-acetamide (21d)**

In a 50 mL flask were added 500 mg (1.67 mmol) of N-methyl-N-phenyl-2-[(phenylcarbamothioyl)amino]acetamide (**15c**), iodomethane (624 μ L, 10.02 mmol) and potassium carbonate (346 mg, 2.5 mmol) in 17 mL of acetonitrile (0.1 N). The suspension was stirred at room temperature and followed by LCMS. After 6 hours the reaction was complete. Ethyl acetate was added to the reaction mixture and the mixture was washed with brine. The aqueous phase was extracted twice by ethyl acetate. Organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated to give the titled product as a yellowish solid (450 mg, 86%).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 314.0

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 7.48-7.43 (m, 2H), 7.38-7.36 (m, 3H), 7.18 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 6.91 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 6.38 (s, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.20 (s, 3H), 2.30 (s, 3H).

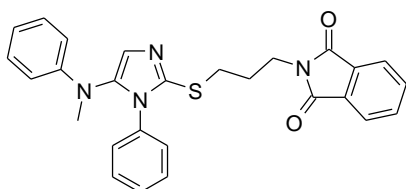
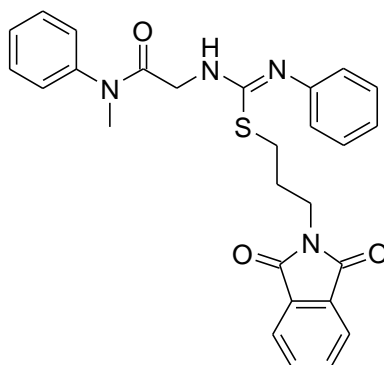
**Step 6: Methyl-(2-methylsulfanyl-3-phenyl-3H-imidazol-4-yl)-phenyl-amine 21**

The titled product was obtained as colorless oil (165 mg, 77%), following Procedure E, using N-Methyl-2-(2-methyl-3-phenyl-isothioureido)-N-phenyl-acetamide (**21d**) (220 mg, 1.0 mmol).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 296.0

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 7.36-7.34 (m, 3H), 7.20-7.15 (m, 4H), 7.01 (s, 1H), 6.77 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 6.667 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 2.96 (s, 3H), 2.60 (s, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) 148.6, 141.9, 138.1, 134.8, 129.2, 128.9, 128.8, 127.1, 124.3, 118.4, 113.1, 39.5, 14.7.

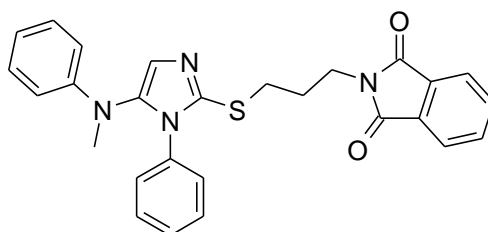
**Composé 22**

Step 5: 2-{2-[3-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-propyl]-3-phenyl-isothioureido}-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**22d**)

N-methyl-N-phenyl-2-[(phenylcarbamothioyl)amino]acetamide (**15c**) (1.67 mmol, 500 mg), 2-(3-Bromo-propyl)-isoindole-1,3-dione (1.67 mmol, 447 mg), potassium carbonate (1.67 mmol, 220 mg) and sodium iodide (0.84 mmol, 125 mg) were added in a flask containing acetonitrile (0.1N, 17 mL). The suspension was stirred at reflux overnight. The reaction was complete after sixteen hours. The solvent was evaporated. The residue was dissolved in ethyl acetate and washed with water and brine. The organic phase was dried over sodium sulphate and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 85/15) to give the titled compound as a yellow oil (479 mg, 59%).

MS $[M+H]^+$ m/z = 487.0

^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm) 7.80 (m, 2H), 7.68 (m, 2H), 7.43-7.34 (m, 3H), 7.20 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 7.13 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 6.90 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 6.77 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.69 (t, $J=6.7\text{Hz}$, 2H), 3.26 (s, 3H), 2.74 (m, 2H), 1.96 (m, 2H).



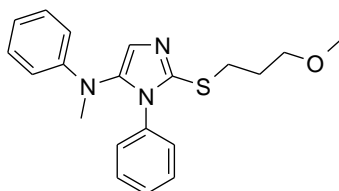
Step 6: 2-{3-[5-(Methyl-phenyl-amino)-1-phenyl-1H-imidazol-2-ylsulfanyl]-propyl}-isoindole-1,3-dione (**22**)

The titled product was obtained as colorless oil (203 mg, 61%), following Procedure E, using 2-{2-[3-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-propyl]-3-phenyl-isothioureido}-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**22d**) (340 mg, 0.7 mmol).

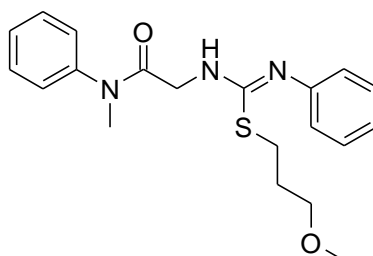
MS $[M+H]^+$ m/z = 469.0

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 7.85-7.79 (m, 2H), 7.72-7.67 (m, 2H), 7.33-7.29 (m, 3H), 7.19-7.14 (m, 4H), 6.91 (s, 1H), 6.76 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 3.78 (t, $J=6.5$ Hz, 2H), 3.13 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.94 (s, 3H), 2.0 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl₃) δ 168.3, 148.6, 140.2, 138.1, 134.8, 133.9, 132.1, 129.1, 128.9, 128.8, 127.3, 124.4, 123.2, 118.4, 113.1, 39.4, 36.9, 29.9, 28.7.



Composé 23

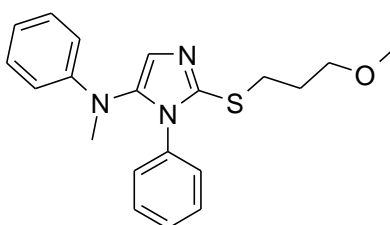


Step 5: 2-[2-(3-Methoxy-propyl)-3-phenyl-isothioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (23d)

In a 50 mL flask was added 500 mg (1.67 mmol) of N-methyl-N-phenyl-2-[(phenylcarbamothioyl)amino]acetamide (**15c**), 1-Bromo-3-methoxy-propane (189 μ L, 1.67 mmol), potassium carbonate (230 mg, 1.67 mmol) and sodium iodide (250 mg, 1.67 mmol) in 17 mL of acetonitrile (0.1 N). The reaction mixture was heated at reflux during 8 hours. Solvent was evaporated. The crude product was dissolved in EtOAc and washed with water and brine to give the titled product as yellow oil (500 mg, 80 %).

MS $[M+H]^+$ m/z = 372.0

1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm) 7.46-7.34 (m, 3H), 7.24-7.20 (m, 4H), 6.98 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 5.78 (brs, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.41 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.33 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 2.88 (m, 2H), 1.87 (m, 2H).



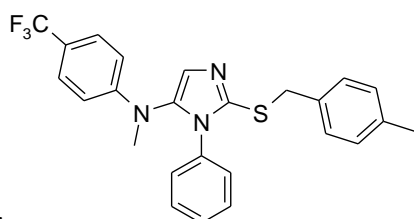
Step 5: [2-(3-Methoxy-propylsulfanyl)-3-phenyl-3H-imidazol-4-yl]-methyl-phenyl-amine (23)

The titled product was obtained as yellow oil (221 mg, 93%), following Procedure E, using 2-[2-(3-Methoxy-propyl)-3-phenyl-isothioureido]-N-methyl-N-phenyl-acetamide (**23d**) (250 mg, 0.66 mmol).

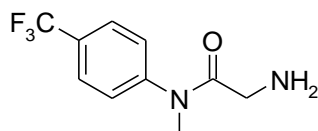
MS $[M+H]^+$ m/z = 354.0

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.36-7.27 (m, 3H), 7.15 (m, 4H), 7.00 (s, 1H), 6.77 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 6.66 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 3.45 (t, $J=6.2\text{Hz}$, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.17 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.95 (s, 3H), 1.97 (m, 2H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 148.6, 140.7, 138.1, 134.9, 129.1, 128.9, 128.8, 127.3, 124.4, 118.4, 113.1, 70.9, 58.6, 39.5, 29.6, 29.5.



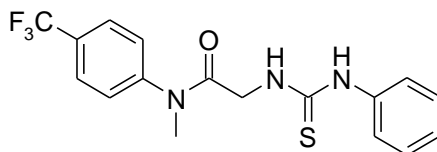
Composé 24



Step 2 and 3: 2-Amino-N-methyl-N-(4-trifluoromethyl-phenyl)-acetamide **24b**

In a 100mL flask was introduced a solution of 4-trifluoromethyl-N-methyl-aniline (1g, 7.8 mmol) and DIEA (2.69 mL, 15.6 mmol) in 20 mL DCM (dried over Na_2SO_4). The solution was stirred at 0°C . Then, a solution of chloroacetyl chloride (0.93 mL, 11.7 mmol) in 20 mL of DCM (dried over Na_2SO_4) was added dropwise in the flask. The mixture was washed with water and brine, the organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated to give brown oil. NMR analysis showed that the expected product had been obtained with about 40 % yield. The starting material was the other product, so reaction was started again. Residue was dissolved in 20mL DCM, DIEA (2.69 mL, 15.6 mmol) was added. Then, a solution of chloroacetyl chloride (0.93 mL, 11.7 mmol) in 20 mL of DCM (dried over Na_2SO_4) was added dropwise at 0°C in the flask. 1 hour after the addition, reaction was not over, so DIEA (1.35 mL, 7.8 mmol) was added, and a solution of chloroacetyl chloride (0.620 mL, 7.8 mmol) in 20 mL of DCM (dried over Na_2SO_4) was added dropwise at 0°C . All starting material had been consumed. Mixture was then washed with water and brine, the organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated to give a brown residue. This residue was dissolved in 13 mL of Ethanol 95° , and was added dropwise in a 500 mL flask containing 150 mL of aqueous ammonia at 55°C . 1 hour after addition, the conversion was complete. The mixture was evaporated to dryness. The residue was then dissolved in DCM, and extracted several times by an aqueous solution of HCOOH 1M. During this extraction, a precipitate appears which was filtered. The filtrate was then evaporated to dryness, and the residue was triturated in acetonitrile. The supernatant was evaporated to dryness, to give the ammonium salt of the titled product as a brown powder. The residue of the trituration was dissolved in DCM, and washed by a saturated aqueous solution of NaHCO_3 . The aqueous phase was extracted by DCM, to give the titled product as a brown solid (281 mg, 50% yield).

MS $[M+H]^+$ m/z = 233.0

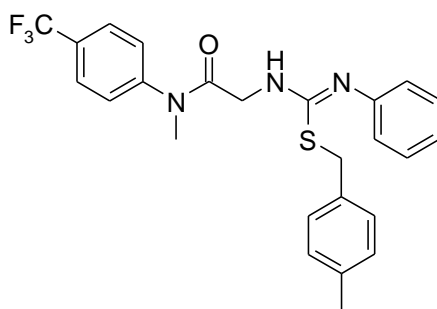


Step 4: N-Methyl-2-(3-phenyl-thioureido)-N-(4-trifluoromethyl-phenyl)-acetamide (**24c**)

Phenylisothiocyanate (222 μ L, 1.86 mmol) and TEA (311 μ L, 2.23 mmol) were added in a 250 mL flask in 2 mL Ethanol. 2-Amino-N-methyl-N-(4-trifluoromethyl-phenyl)-acetamide **24b** (1.86 mmol) was dissolved in 23 mL of ethanol and TEA (259 μ L, 1.86 mmol) was then added. This solution was added dropwise at r.t to the flask. After addition, reaction was over. Reaction mixture as then evaporated, the residue was purified by flash chromatography (pure cHex to cHex/EtOAc 7/3), to give the titled product as a white powder (357 mg, 52 %).

MS $[M+H]^+$ m/z = 368.0

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 3.26 (s, 3H) ; 4.15 (s, 2H) ; 7.11 (t, 1H, J = 7.3 Hz) ; 7.33 (t, 2H, J = 7.9 Hz) ; 7.45 (d, 2H, J = 7.5 Hz) ; 7.65 (d, 2H, J = 8.3 Hz) ; 7.80 (t, 1H, J = 4.3 Hz) ; 7.85 (d, 2H, J = 8.4 Hz) ; 9.93 (s, 1H).

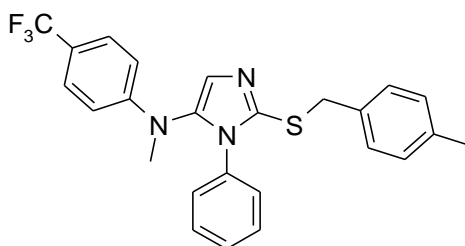


Step 5: N-Methyl-2-[2-(4-methyl-benzyl)-3-phenyl-isothioureido]-N-(4-trifluoromethyl-phenyl)-acetamide (**24d**)

In a 25 mL flask were added N-Methyl-2-(3-phenyl-thioureido)-N-(4-trifluoromethyl-phenyl)-acetamide (**24c**) (0.346 g, 0.94 mmol), Potassium Carbonate (130 mg, 0.94 mmol), sodium iodide (71 mg, 0.47 mmol), and 5 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 10 min, and 1-bromomethyl-4-methylbenzene (174 mg, 0.94 mmol) was then added. The suspension was stirred at room temperature for 3 hours. The medium was then dissolved in EtOAc (30 mL), washed with water and brine. The aqueous phase was extracted by DCM. Organic phases are dried over Na_2SO_4 and evaporated. Residue was purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 8/2) to give the titled product as a yellowish solid (269 mg, 61 %).

MS $[M+H]^+$ m/z = 472.0

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 2.24 (s, 3H) ; 3.26 (s, 3H) ; 3.89 (brs, 2H) ; 4.06 (s, 2H) ; 6.63 (d, 2H, J = 7.6 Hz) ; 6.70 (brs, 1H) ; 6.90 (t, 1H, J = 7.3 Hz) ; 7.08 (d, 2H, J = 7.9 Hz) ; 7.17 (m, 4H) ; 7.60 (d, 2H, J = 8.4 Hz) ; 7.81 (d, 2H, J = 8.4 Hz).



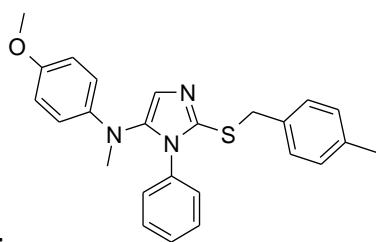
Step 6: Methyl-[2-(4-methyl-benzylsulfanyl)-3-phenyl-3H-imidazol-4-yl]-(4-trifluoromethyl-phenyl)-amine (**24**)

The titled product was obtained as white solid (170 mg, 71%), following Procedure E, using N-Methyl-2-[2-(4-methyl-benzyl)-3-phenyl-isothioureido]-N-(4-trifluoromethyl-phenyl)-acetamide (**24d**) (250 mg, 0.53 mmol).

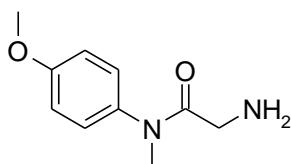
MS $[M+H]^+$ m/z = 454.0

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 2.27 (s, 3H) ; 3.02 (s, 3H) ; 4.20 (s, 2H) ; 6.65 (d, 2H, J = 8.6 Hz) ; 6.99 (m, 2H) ; 7.10 (m, 5H) ; 7.32 (m, 3H) ; 7.42 (d, 2H, J = 8.6 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 20.7 ; 26.3 ; 37.0 ; 112.6 ; 118.0 (q, J = 32.2 Hz) ; 124.3 ; 125.5 (q, J = 270.6 Hz) ; 126.1 ; 127.4 ; 128.8-129.0 (m) ; 134.3 ; 134.6 ; 136.5 ; 136.8 ; 139.7 ; 151.1.



Composé 25

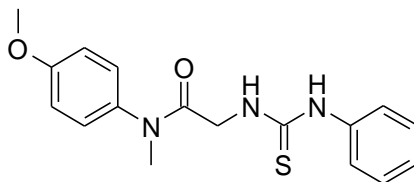


Step 2 & 3: 2-Amino-N-(4-methoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**25b**)

In a 100mL flask was introduced a solution of 4-methoxy-N-methyl-aniline (1g, 7.0 mmol) and DIEA (2.41 mL, 14.0 mmol) in 15 mL of DCM (dried over Na_2SO_4). The solution was stirred at 0°C. Then, a solution of chloroacetyl chloride (0.835 mL, 10.5 mmol) in 20 mL of DCM (dried over Na_2SO_4) was added dropwise in the flask. The mixture was then evaporated to dryness to give a brown residue. This residue was then dissolved in 12 mL of Ethanol 95°, and was added dropwise in a 250 mL flask containing 130 mL of aqueous ammonia at 65°C. After the addition, heating was stopped. The mixture was evaporated to dryness. The residue was then dissolved in DCM, and extracted several times by an aqueous solution of HCOOH 1M. During this extraction, a precipitate appeared which was filtered. The filtrate was then evaporated to dryness, and the residue was triturated in acetonitrile. The

supernatant was evaporated to dryness, to give the ammonium salt of the titled product as brown oil (1,58 g, 82 %).

MS $[M+H]^+$ m/z = 195.1

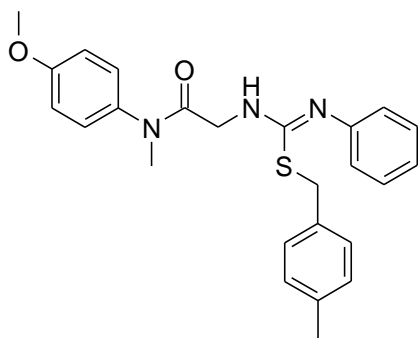


Step 4: N-(4-Methoxy-phenyl)-N-methyl-2-(3-phenyl-thioureido)-acetamide (**25c**)

Phenylisothiocyanate (671 μ L, 5.61 mmol) and TEA (938 μ L, 6.74 mmol) were added in a 250 mL flask in 4 mL Ethanol. 2-Amino-N-(4-methoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**25b**) as an ammonium salt (1.55g, 5.61 mmol) was dissolved in 76 mL of ethanol and TEA (782 μ L, 5.61 mmol) was then added. This solution was added dropwise at r.t. to the flask. After addition, a precipitation occurred. The suspension was partially evaporated, and then filtered. The residue was dried under vacuum to give a brown powder corresponding to the pure expected product. The filtrate was then evaporated and a precipitation was performed by adding isopropanol over the residue. After filtration, a brown powder was obtained that correspond to the titled product. Both powders were pulled together. (1,85 g, 100%).

MS $[M+H]^+$ m/z = 330.0

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) : δ (ppm) 3.15 (s, 3H) ; 3.79 (s, 3H) ; 3.96 (d, 2H, J = 4.3 Hz) ; 7.03 (d, 2H, J = 8.9 Hz) ; 7.10 (t, 1H, J = 7.4 Hz) ; 7.32 (m, 4H) ; 7.46 (d, 2H, J = 7.8 Hz) ; 7.74 (t, 1H, J = 4.3 Hz) ; 9.93 (s, 1H).



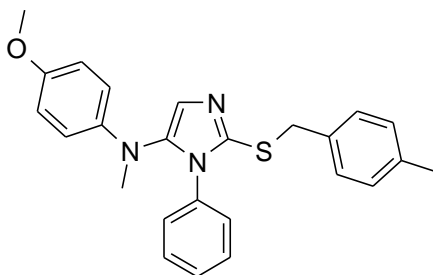
Step 5: N-(4-Methoxy-phenyl)-N-methyl-2-[2-(4-methyl-benzyl)-3-phenyl-isothioureido]-acetamide (**25d**)

In a 25 mL flask were added N-(4-Methoxy-phenyl)-N-methyl-2-(3-phenyl-thioureido)-acetamide (**25c**) (0.500 g, 1.52 mmol), Potassium Carbonate (0.21 g, 1.52 mmol), sodium Iodide (0.11g, 0.76 mmol), and 7.5 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 10 min, and 1-bromomethyl-4-methylbenzene (0.281 g, 1.52 mmol) was then added. After 4 hours, no more bromide was detected, though some starting material remains, so 14 mg of bromide and 10 mg of K_2CO_3 were added. Reaction was over after 3 hours. The medium was then dissolved in EtOAc (30 mL), washed with water and brine. The

aqueous phase was extracted by DCM. Organic phases were dried over sodium sulphate and evaporated to give the titled product as a yellow solid (643 mg, 98%).

MS $[M+H]^+$ m/z = 433.9

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 2.44 (s, 3H) ; 3.15 (s, 3H) ; 3.69 (s, 2H) ; 3.76 (s, 3H) ; 4.08 (s, 2H) ; 6.53 (brs, 1H) ; 6.64 (d, 2H, J = 6.7 Hz) ; 6.90 (t, 1H, J = 7.3 Hz) ; 6.98 (d, 2H, J = 8.9 Hz) ; 7.08 (d, 2H, J = 8.0 Hz) ; 7.16 (m, 4H) ; 7.28 (d, 2H, J = 8.6 Hz).



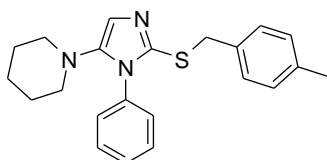
Step 6: (4-Methoxy-phenyl)-methyl-[2-(4-methyl-benzylsulfanyl)-3-phenyl-3H-imidazol-4-yl]-amine (**25**)

The titled product was obtained as yellowish solid (190 mg, 50%), following Procedure E, using N-(4-Methoxy-phenyl)-N-methyl-2-[2-(4-methyl-benzyl)-3-phenyl-isothioureido]-acetamide (**25d**) (400 mg, 0.92 mmol).

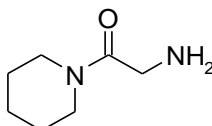
MS $[M+H]^+$ m/z = 416.0

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 2.28 (s, 3H) ; 2.91 (s, 3H) ; 3.63 (s, 3H) ; 4.15 (s, 2H) ; 6.46 (d, 2H, J = 9.1 Hz) ; 6.69 (d, 2H, J = 9.1 Hz) ; 6.94 (m, 3H) ; 7.09 (m, 4H) ; 7.30 (m, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 20.7 ; 26.3 ; 37.1 ; 114.2 ; 114.4 ; 123.4 ; 127.4 ; 128.8-128.9 (m) ; 134.6 ; 136.4 ; 138.4 ; 139.1 ; 142.5 ; 152.2.



Composé 26

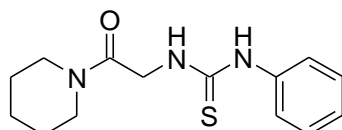


Step 2 & 3: 2-Amino-1-piperidin-1-yl-ethanone (**26b**)

A solution of piperidine (10 mmol, 990 μL) and DIEA (20 mmol, 3.4 mL) in dry dichloromethane (0.2M, 45 mL) was introduced into a flask. The solution was stirred at -5°C . Then, a solution of chloroacetyl chloride (15 mmol, 1.193 mL) in DCM (5 mL) was added dropwise to the flask. After this, the mixture was evaporated to dryness to obtain the 2-

chloro-1-(piperidin-1-yl)ethan-1-one. 2-chloro-1-(piperidin-1-yl)ethan-1-one (10 mmol, 1.616 g). It was then dissolved in ethanol 95° (0.6M, 16 mL) and added dropwise to a flask containing aqueous ammonia (10,8mol, 206 mL) at 65°C. After the addition, heating was stopped. The mixture was evaporated to dryness. The residue was dissolved in distilled water. The pH was adjusted to 10 by addition of NaOH_{aq}. Then, an extraction was carried out with dichloromethane. The organic phase was dried with sodium sulphate, filtered and evaporated to dryness to give the titled compound. It would enter the next step without further purification.

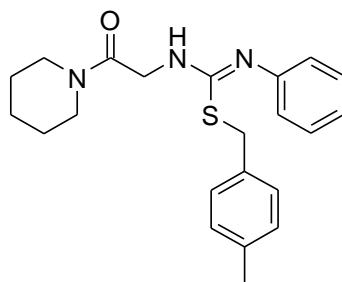
MS [M+H]⁺ m/z = 143.0



Step 4: 1-(2-Oxo-2-piperidin-1-yl-ethyl)-3-phenyl-thiourea (26c)

2-Amino-1-piperidin-1-yl-ethanone (**26b**) (9.772 mmol, 1.389 g) was dissolved in absolute ethanol (0.076M, 120 mL). Then TEA (11.73 mmol, 1.582 mL) was added to this solution. Phenyl isothiocyanate (9.772 mmol, 1.169 mL) in ethanol (8 mL) was added dropwise to this mixture at room temperature. After the addition, stirring was continued for 1 hour to complete the reaction. The reaction mixture was evaporated to dryness and precipitated in isopropyl alcohol. A filtration was done to obtain the titled compound as a pink powder (1.42 g, 52% over the three steps).

MS [M+H]⁺ m/z = 278.0

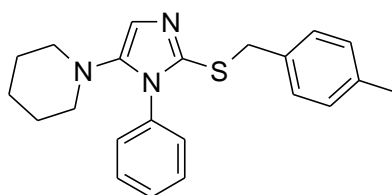


Step 5: 2-(4-Methyl-benzyl)-1-(2-oxo-2-piperidin-1-yl-ethyl)-3-phenyl-isothioureia (26d)

1-(2-Oxo-2-piperidin-1-yl-ethyl)-3-phenyl-thiourea (**26c**) (2.163 mmol, 600 mg), potassium carbonate (2.163, 299 mg) and sodium iodide (1.082 mmol, 162 mg) were added in a flask containing acetonitrile (0.2M, 11 mL). The suspension was stirred at room temperature for 10 minutes and then 1-bromomethyl-4-methylbenzene (2.163 mmol, 400 mg) was added. The suspension was stirred for 1,5h to complete the reaction. The solvent was evaporated. Ethyl acetate was added to the reaction mixture and then a washing was done with water and brine. The organic phases were dried over sodium sulphate and evaporated. The desired product precipitates in cyclohexane. This is filtered to give the titled compound as a yellowish powder (250 mg, 30%).

MS [M+H]⁺ m/z = 382.0

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 7.28-7.23 (m, 2H), 7.20 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.10 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.01 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), 5.97 (s, 1H), 4.16 (s, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.61 (m, 2H), 3.36 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.66-1.58 (m, 6H).



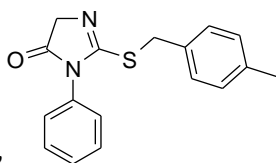
Step 6: 1-[2-(4-Methyl-benzylsulfanyl)-3-phenyl-3H-imidazol-4-yl]-piperidine (**26**)

The titled product was obtained as yellowish solid (72 mg, 31%), following Procedure E, using 2-(4-Methyl-benzyl)-1-(2-oxo-2-piperidin-1-yl-ethyl)-3-phenyl-isothioureia (**26d**) (242 mg, 0.67 mmol).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 364.0

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 7.42-7.37 (m, 3H), 7.20-7.16 (m, 2H), 7.05 (m, 4H), 6.64 (s, 1H), 4.12 (s, 2H), 2.68 (m, 4H), 2.30 (s, 3H), 1.41 (m, 6H).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 146.0, 137.4, 136.9, 135.7, 134.1, 129.1, 128.9, 128.8, 128.1, 127.4, 114.8, 52.5, 38.4, 25.6, 23.9, 21.1



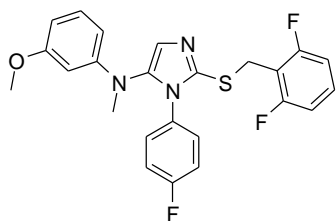
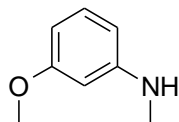
Composé 16'

2-(4-Methyl-benzylsulfanyl)-3-phenyl-3,5-dihydro-imidazol-4-one (**16'**)

Compound **16'** was obtained during the synthesis of compound **26** (see above) (128 mg, 68%).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 297.0

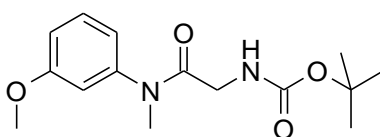
^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 7.48-7.41 (m, 3H), 7.30-7.25 (m, 4 H), 7.12 (d, $J= 7.8$ Hz, 2H), 4.39 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 2.33 (s, 3H).

**Composé 27****Step 1: 3-methoxy-N-methyl-aniline (27a)**

In a 25mL flask were added 3-methoxyaniline (2.0 mmol, 0.224 mL) and sodium methoxide (10 mmol, 545 mg) in 3.5 mL of anhydrous methanol. Then, paraformaldehyde (4 mmol, 119 mg) was diluted in 1.5 mL of anhydrous methanol and the solution was added to the mixture. Molecular sieves (4 Å) is then added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was heated under reflux for 1 hour with sodium borohydride (2 mmol, 75.6 mg), then sodium borohydride (3.172mmol, 120mg) was added again and reaction mixture was stirred under reflux for 3 hours. The reaction mixture was filtered on Celite, evaporated, dissolved in EtOAc and water, and the two phases were separated. The aqueous phase was then basified by addition of saturated NaHCO_3 aq, and extracted by EtOAc. The organic phase were washed by saturated NaHCO_3 aq and by brine, dried over MgSO_4 , evaporated and dried under reduced pressure to give the titled product as a brown oil (266 mg, 96%).

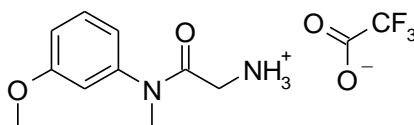
MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 138.0

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2.84 (s,3H); 3.78 (s,3H); 6.19 (t,1H, J = 2.3Hz); 6.26-6.31 (m,2H) ; 7.10 (t,1H, J = 8.1Hz).

**Step 2': tert-butyl N-[2-(3-methoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (27b)**

In a 25 mL flask was added 3-methoxy-N-methyl-aniline (**27a**) (1.554 mmol, 213 mg) in 1 mL of EtOAc. Then 2-(tert-butoxycarbonylamino)acetic acid (1.865 mmol, 326 mg), T3P (2.331mmol, 1.374 mL) and DIEA (4.662 mmol, 814 μL) were added, and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. Then the reaction mixture was diluted with ethyl acetate. The solution was washed by water, then by saturated NaHCO_3 aq and brine. The organic phase was dried over MgSO_4 , and filtered and then evaporated and dried under reduced pressure to give a light brown solid. This residue was purified by flash chromatography (DCM/cyclohexane 9/1 to pure DCM and then DCM/ MeOH 1000/1) to give the expected product as a yellowish powder (444mg, 97%).

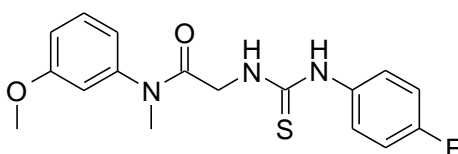
MS : $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 295.2



Step 3': [2-(3-methoxy-*N*-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl] ammonium; 2,2,2-trifluoroacetate
(**27c**)

Tert-butyl *N*-[2-(3-methoxy-*N*-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (**27b**) (444.4mg, 1.510mmol) was dissolved in 4 mL of DCM. TFA (19.97mmol, 1.529mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. Solvent was removed to give a viscous reddish oil. 699 mg of residue were obtained corresponding to the expected product and to a rest of 3-methoxy-*N*-methyl-aniline. Residue was used in the next step without further purification.

MS : [M+H]⁺ *m/z* = 195.1

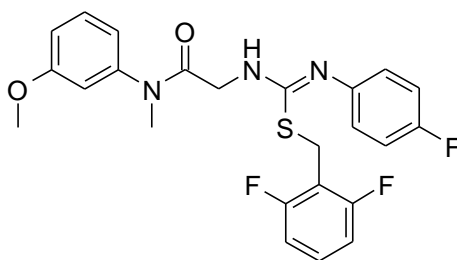


Step 4: *N*-(3-methoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-methyl-acetamide
(**27d**)

In a 100 mL flask were added 1-fluoro-4-isothiocyanato-benzene (1.287mmol, 446 mg) and TEA (1.544mmol, 0.208ml) in 2 mL of Ethanol. To this was added dropwise at room temperature a solution of [2-(3-methoxy-*N*-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl] ammonium; 2,2,2-trifluoroacetate (**27c**) (1.287mmol, 446 mg) and TEA (4.254 mmol, 0.574 mL) in 20 mL of ethanol. Reaction mixture was evaporated to dryness to give an oil. This oil was purified by flash chromatography (pure DCM to DCM / methanol 98/2), to give the titled product as a white solid (361 mg, 69 %).

MS : [M+H]⁺ *m/z* = 386.0

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) 3.19 (s, 3H) ; 3.78 (s, 3H) ; 4.03 (brs, 2H) ; 6.92-7.04 (m, 3H) ; 7.09-7.21 (m, 2H) ; 7.30-7.50 (m, 3H) ; 7.68-7.79 (m, 1H).

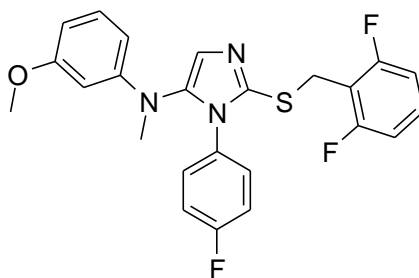


Step 5: 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3-methoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**27e**)

The titled product was obtained as an orange solid (136 mg, 94 %) following procedure C without purification, using *N*-(3-methoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-methyl-acetamide (**27d**) (100 mg, 288 μ mol) and 2-(bromomethyl)-1,3-difluoro-benzene (60 mg, 288 μ mol).

MS : [M+H]⁺ m/z = 474.1

¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 3.32 (s, 3H) ; 3.81 (s, 3H) ; 3.90 (brs, 2H) ; 4.13 (brs, 2H) ; 6.68-6.96 (m, 9H) ; 7.16-7.26 (m, 1H) ; 7.34 (t, 1H, J = 8.1 Hz).



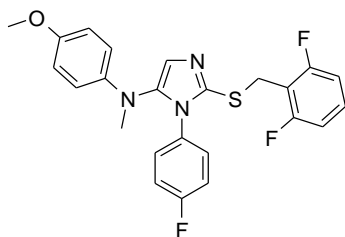
Step 6: [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3-methoxy-phenyl)-methyl-amine (**27**)

2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-(3-methoxy-phenyl)-*N*-methyl-acetamide (**27e**) (136 mg, 0.27 mmol) was dissolved in 2.7 mL of ethyl acetate. DIEA (283 μ L, 1.62 mmol), and T3P in EtOAc (477 μ L, 0.83 mmol) were then added. The mixture was heated with microwave at 150°C for 10 min. DIEA (283 μ L, 1.62 mmol), and T3P in EtOAc (477 μ L, 0.83 mmol) were added again, and reaction mixture was heated again under microwave irradiation at 150°C for 10 min. DIEA (142 μ L, 0.81 mmol), and T3P in EtOAc (240 μ L, 0.41 mmol) were added again, and reaction mixture was heated again under microwave irradiation at 150°C for 10 min. DIEA (142 μ L, 0.81 mmol), and T3P in EtOAc (240 μ L, 0.41 mmol) were added again, and reaction mixture was heated again under microwave irradiation at 150°C for 10 min. Reaction mixture was then diluted with EtOAc, washed with water, saturated NaHCO₃ aq, and brine. Organic phase was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Residue was then purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 85/15), to give the titled compound as an orange residue (12.1 mg, 10 %).

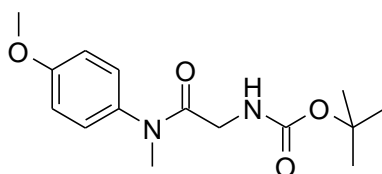
MS [M+H]⁺ m/z = 456.1

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2.91 (s, 3H) ; 3.77 (s, 3H) ; 4.19 (s, 2H) ; 6.22 (t, 1H, $J = 2.3$ Hz) ; 6.25 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.3$ Hz) ; 6.37 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.3$ Hz) ; 6.81-6.86 (m, 2H) ; 6.94-6.99 (m, 4H) ; 7.05 (s, 1H) ; 7.10 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz) ; 7.15-7.25 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 25.8 ; 39.4 ; 55.2 ; 99.9 ; 103.5 ; 106.3 ; 111.3 (m) ; 113.5 (t, $J = 19.3$ Hz) ; 116.0 (d, $J = 22.9$ Hz) ; 125.3 ; 129.1 (d, $J = 8.8$ Hz) ; 129.2 (t, $J = 10.3$ Hz) ; 129.8 ; 130.7 (d, $J = 3.1$ Hz) ; 138.5 ; 138.7 ; 149.9 ; 160.6 ; 161.2 (dd, $J = 250.2$ Hz, $J = 7.6$ Hz) ; 162.3 (d, $J = 249.3$ Hz).



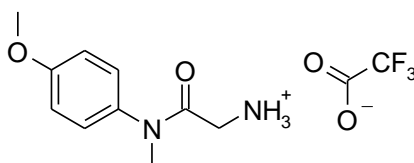
Composé 28



Step 2': tert-butyl *N*-[2-(4-methoxy-*N*-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (**28a**)

In a 25 mL flask was added commercial 4-methoxy-*N*-methyl-aniline (274 mg, 2mmol) in 4mL of EtOA . Then 2-(tert-butoxycarbonylamino)acetic acid (420 mg, 2.4mmol), T3P (1.768mL, 3mmol) and DIEA (1.048 mL, 6mmol) were added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature. Then the reaction mixture was diluted with ethyl acetate, washed with water, saturated NaHCO_3 aq and brine. The organic phase was dried over MgSO_4 , filtered and then evaporated, to give the titled product as a bronze solid (463 mg, 79 %).

MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z =295.1

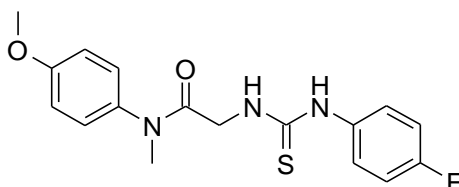


Step 3': [2-(4-methoxy-*N*-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl] ammonium; 2,2,2-trifluoroacetate (**28b**)

Tert-butyl *N*-[2-(4-methoxy-*N*-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (**28a**) (463.70 mg, 1.575 mmol) was dissolved in 4 mL of DCM. TFA (20.84 mmol, 1.595 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. Solvent was removed to give a viscous reddish oil. 510 mg of residue was obtained corresponding to the expected product and to a rest of 4-methoxy-*N*-methyl-aniline. Residue was used in the next step without further purification.

MS : $[M+H]^+$ m/z = 195.0

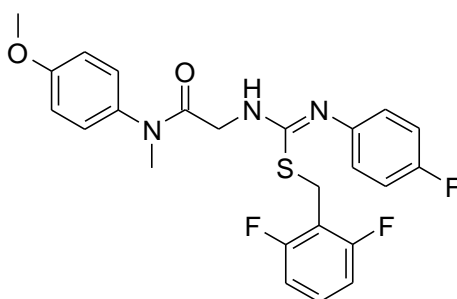
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 3.20 (s, 3H) ; 3.57 (s, 2H) ; 3.83 (s, 3H) ; 6.95 (d, 2H, $J=8.9$ Hz) ; 7.12 (d, 2H, $J=9.0$ Hz) ; 7.80 (s, 3H).



Step 4 : *N*-(4-methoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-methyl-acetamide (**28c**)

In a 100 mL flask were added 4-fluorophenylisothiocyanate (1.575mmol, 241 mg) and TEA (1.890mmol, 0.255ml) in 5 mL of Ethanol. To this was added dropwise at room temperature a solution of [2-(4-methoxy-*N*-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl] ammonium; 2,2,2-trifluoroacetate (**28b**) (1.575mmol, 485 mg) and TEA (1.575 mmol, 0.213 mL) in 20 mL of Ethanol. Reaction mixture was evaporated to dryness to give 865mg of pale green powder, corresponding to the titled product. Residue was used in the next step without further purification.

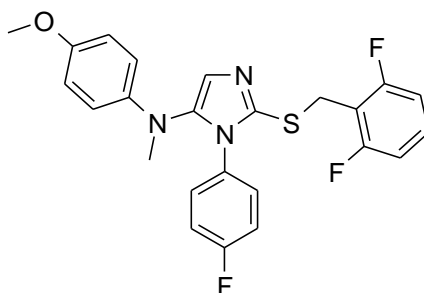
$[M+H]^+$ m/z = 348.0



Step 5 : 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-(4-methoxy-phenyl)-*N*-methyl-acetamide (**28d**)

The titled product was obtained as yellow oil (727 mg, 97 %) following procedure C without purification, using *N*-(4-methoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-methyl-acetamide (**28c**) (547 mg, 1.575 mmol) and 2-(bromomethyl)-1,3-difluoro-benzene (513 mg, 2.481mmol).

$[M+H]^+$ m/z = 475.1



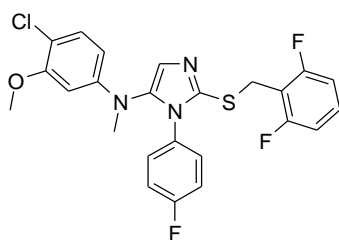
Step 6: [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(4-methoxy-phenyl)-methyl-amine (**28**)

The titled product was obtained as an orange powder (120 mg, 17%), following Procedure E, using 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(4-methoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**28d**) (1.535mmol, 726 mg).

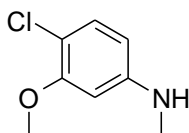
[M+H]⁺ m/z = 456.1

¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 2.92 (s, 3H); 3.76 (s, 3H); 4.18 (brs, 2H); 6.57-6.60 (m, 2H); 6.70-6.77 (m, 2H); 6.80-6.86 (m, 2H); 6.92-6.95 (m, 4H); 7.00 (s, 1H); 7.15-7.23 (m, 1H)

¹³C-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 25.9 ; 40.2 ; 55.7 ; 111.3 (m) ; 113.6 ; 114.4 ; 115.4 ; 115.9 (d, J = 23.0 Hz) ; 124.1 ; 129.0-129.3 (m) ; 130.9 (d, J = 3.4 Hz) ; 138.1 ; 140.0 ; 142.7 ; 153.1 ; 161.3 (dd, J = 250.0 Hz, J = 7.4 Hz) ; 162.3 (d, J = 249.2 Hz).



Composé 29

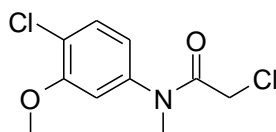


Step 1: (4-Chloro-3-methoxy-phenyl)-methyl-amine (**29a**)

In a 50 mL flask were added 4-Chloro-3-methoxy-phenylamine (907 mg), sodium methoxide (1.56 g), 10 mL anhydrous methanol, and paraformaldehyde (690 mg). Reaction mixture was then stirred overnight at room temperature. Then, paraformaldehyde (173 mg) and sodium methoxyde (311 mg) were added, and reaction mixture was heated at reflux for 1 hour. Sodium borohydride (436 mg) was then added, and reaction mixture was stirred at reflux for 4 hours. Once back at room temperature, mixture is partially evaporated, and KOH_{aq} 1M (50 mL) was then added. The obtained suspension was extracted by Et₂O, organic phase was dried over Na₂SO₄ and evaporated. The obtained residue was purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 8/2) to give the titled product as a brown powder (650 mg, 66 %).

MS [M+H]⁺ m/z = 171.9

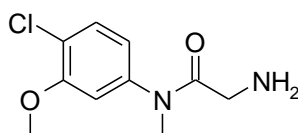
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 2.66 (d, $J = 4.9$ Hz, 3H) ; 3.77 (s, 3H) ; 5.80 (q, $J = 4.9$ Hz, 1H) ; 6.09 (dd, $J = 2.5$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1H) ; 6.25 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H) ; 7.04 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H).



Step 2: 2-Chloro-N-(4-chloro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (29b)

In a 100 mL flask were introduced a solution of 620 mg of (4-Chloro-3-methoxy-phenyl)-methyl-amine (**29a**) and 1.7 mL of DIPEA in 18 mL of DCM (dried over Na_2SO_4). The solution was stirred at 0°C . Then, a solution of 568 μL of chloroacetyl chloride in 14 mL of DCM (dried over Na_2SO_4) was added dropwise in the flask. The mixture was then evaporated to dryness to give a brown residue which was used without further purification in the next step.

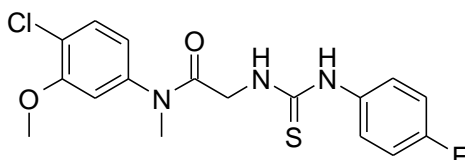
MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 248.0$



Step 3: 2-Amino-N-(4-chloro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (29c)

Residue corresponding to 2-Chloro-N-(4-chloro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**29b**) (3.6 mmol) was dissolved in 6mL EtOH 95° . The obtained solution was added dropwise in aqueous ammonia (30% w/w, 75 mL) at 65°C . After 1 hour stirring at 65°C , reaction mixture was evaporated. The residue was dissolved in water, pH is adjusted to 10, and the solution was extracted several times by DCM. Organic phases were dried over Na_2SO_4 and evaporated, to give a brown oily residue. It was used in the next step without further purification.

MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 229.0$



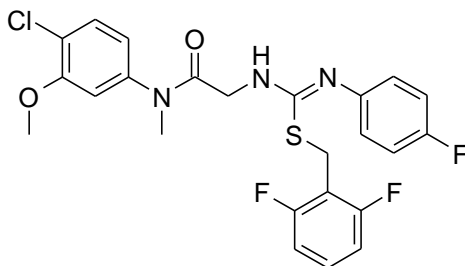
Step 4: N-(4-Chloro-3-methoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluorophenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (29d)

In a 250 mL flask, 4-fluorophenylisothiocyanate (551.4 mg) and TEA (583 μL) were dissolved in 3 mL Ethanol. To this was added dropwise at room temperature a solution 2-Amino-N-(4-chloro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**29c**) in 48 mL Ethanol. After 1 hour stirring

at room temperature, mixture was evaporated to dryness, and residue was purified by flash chromatography (cHex/DCM 1/1 to pure DCM). The titled product was obtained as a yellowish powder (546 mg, 39 % yield over the 3 steps).

MS $[M+H]^+$ m/z = 382.1

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 3.21 (s, 3H) ; 3.88 (s, 3H) ; 4.06 (brs, 2H) ; 7.01 (m, 1H) ; 7.16 (m, 2H) ; 7.26 (brs, 1H) ; 7.45 (m, 2H) ; 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 1H) ; 7.76 (brs, 1H) ; 9.90 (brs, 1H).

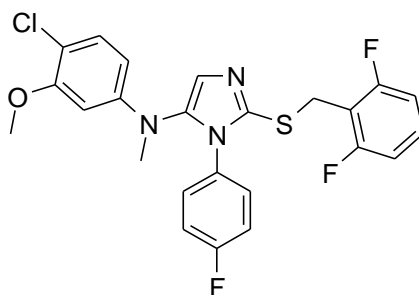


Step 5 : N-(4-Chloro-3-methoxy-phenyl)-2-[2-(2,6-difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**29e**)

The titled product was obtained as an oily residue (603 mg, 87 %), without purification, following Procedure C, using N-(4-Chloro-3-methoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**29d**) (468 mg) and 2-Bromomethyl-1,3-difluorobenzene (254 mg).

MS $[M+H]^+$ m/z = 508.2

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 3.20 (s, 3H) ; 3.79-3.89 (m, 5H) ; 4.19 (s, 2H) ; 6.23 (brs, 2H) ; 6.95-7.10 (m, 6H) ; 7.18 (s, 1H) ; 7.38 (m, 1H) ; 7.48 (m, 1H).



Step 6: (4-Chloro-3-methoxy-phenyl)-[2-(2,6-difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-methyl-amine (**29**)

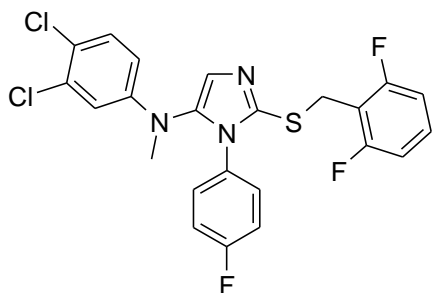
In a microwave tube were introduced N-(4-Chloro-3-methoxy-phenyl)-2-[2-(2,6-difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**29e**) (145 mg), 3 mL of ethyl acetate, DIPEA (74,8 μL), and T3P[®] (168 μL). Reaction mixture was then heated twice under microwave irradiation, 10 min at 100°C. T3P[®] (348 μL) and DIPEA (206 μL) were then added, and the mixture was heated at 150°C for 20 min under microwave irradiation. Reaction mixture was washed by saturated NaHCO_3 aq, and brine. Organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated. The obtained residue was purified by Flash Chromatography

(DCM/cHex then DCM/MeOH) to give a yellowish residue corresponding to the titled product (83 mg, 59%).

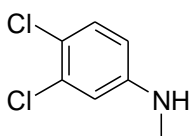
MS $[M+H]^+$ m/z = 508.2

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 2.96 (s, 3H) ; 3.75 (s, 3H) ; 4.08 (s, 2H) ; 6.09 (dd, J = 2.7 Hz, J = 8.8 Hz, 1H) ; 6.27 (d, J = 2.6 Hz, 1H) ; 7.02-7.07 (m, 3H) ; 7.11-7.15 (m, 3H) ; 7.21 (m, 2H) ; 7.37 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 26.0 ; 26.8 ; 56.2 ; 98.2 ; 106.4 ; 110.7 ; 112.1 (d, J = 23.9 Hz) ; 113.8 (t, J = 19.9 Hz) ; 116.5 (d, J = 23.2 Hz) ; 125.2 ; 130.0 ; 130.1 (d, J = 9.1 Hz) ; 130.5 (t, J = 10.9 Hz) ; 131.2 ; 137.9 ; 138.6 ; 149.0 ; 155.3 ; 161.0 (dd, J = 248.8 Hz, J = 7.4 Hz) ; 162.3 (d, J = 245.9 Hz).



Composé 30

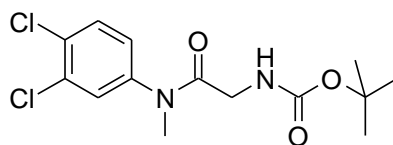


Step 1: 3,4-dichloro-N-methyl-aniline (30a)

In a 25mL flask were added 3,4-dichloroaniline (324 mg, 2.0 mmol) and sodium methoxide (540 mg, 10 mmol) in 3.5 mL of anhydrous methanol. Then, paraformaldehyde (120 mg, 4 mmol) was diluted in 1.5 mL of anhydrous methanol and the solution was added to the mixture. Molecular sieves (4 Å) was then added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was then heated under reflux for 1 hour with sodium borohydride (151 mg, 4 mmol). Reaction mixture was then filtered on Celite, evaporated, residue was dissolved in EtOAc and water, and the two phases were separated. Aqueous phase was then basified by addition of saturated NaHCO_3 aq, and extracted by EtOAc. Organic phases were washed by saturated NaHCO_3 aq, and by brine, dried over MgSO_4 , evaporated and dried under vacuum to give a yellow oil corresponding to the titled product (227 mg, 64 %).

MS $[M+H]^+$ m/z = 179.9

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2,83 (s, 3H); 6,48 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.8 Hz) ; 6,70 (d, J = 2.8 Hz, 1H); 7.21 (d, 1H, J = 8.8 Hz).

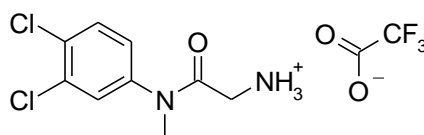


Step 2': tert-butyl N-[2-(3,4-dichloro-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (**30b**)

In a 10 mL flask were 3,4-dichloro-N-methyl-aniline (**30a**) (226 mg, 1.287mmol) in 2.6 mL of EtOAc . Then 2-(tert-butoxycarbonylamino)acetic acid (608 mg, 3.474 mmol), T3P (2.2747 ml, 3.859 mmol) and DIEA (1.012 mL, 5.791 mmol) were added. The mixture was stirred at 40°C for 2 days. Then the reaction mixture was diluted with ethyl acetate, washed with water, saturated NaHCO₃ _{aq} and brine. The organic phase was dried over MgSO₄, and evaporated to dryness to give a yellowish oil. For the next step, yield is considered to be 100%.

MS [M+H-H₂C=C(CH₃)₂]⁺ *m/z* = 277.0

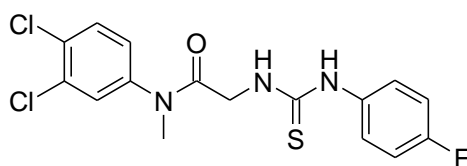
¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 1.4 (m, 9H) ; 3.25 (s, 3H) ; 3.65 (s, 2H) ; 3.35 (s, 1H) ; 7.1 (dd, 1H, *J* = 2.4Hz , *J* = 8.4Hz) ; 3.37 (d, 2H, *J* = 2.3Hz) ; 7.72 (d, 1H, *J* = 8.5Hz).



Step 3': [2-(3,4-dichloro-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl] ammonium; 2,2,2-trifluoroacetate (**30c**)

Tert-butyl N-[2-(3,4-dichloro-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (**30b**) (428 mg, 1.287mmol) was dissolved in 4 mL of DCM. TFA (1.303mL, 17.03mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. Solvent was removed to give an oil. Residue was used in the next step without further purification.

MS [M+H]⁺ *m/z* = 235.1



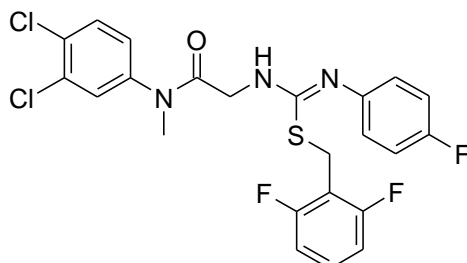
Step 4 : N-(3,4-dichloro-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**30d**)

In a 100 mL flask were added 4-fluorophenylisothiocyanate (237 mg, 1.54 mmol) and TEA (0.208ml, 1.544mmol) in 2 mL of Ethanol. To this was added dropwise at room temperature a solution of [2-(3,4-dichloro-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl] ammonium; 2,2,2-trifluoroacetate (**30c**) (446 mg 1.287mmol) and TEA (0.574 mL, 4.25 mmol) in 20 mL of ethanol. Reaction mixture was then evaporated to dryness. The residue was purified by flash

chromatography (DCM to DCM/methanol 98/2), to give a white solid corresponding to the titled product (550mg, quantitative yield).

MS $[M+H]^+$ m/z = 386.0

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.21 (s, 3H) ; 4.09 (s, 2H) ; 7.16 (m, 2H) ; 7.41-7.47 (m, 3H) ; 7.74-7.80 (m, 3H) ; 9.90 (s, 1H)

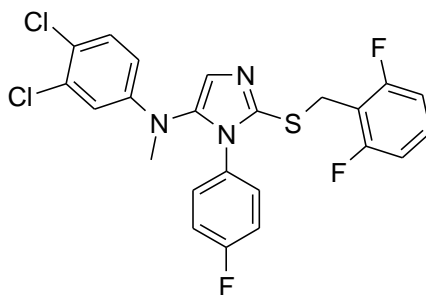


Step 5 : 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dichloro-phenyl)-N-methyl-acetamide (**30e**)

The titled product was obtained as a yellowish oil (334 mg, 90 %), without purification, following Procedure C, using *N*-(3,4-dichloro-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-methyl-acetamide (**30d**) (280 mg, 0.725 mmol) and 2-Bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (150 mg, 0.725mmol).

MS : $[M+H]^+$ m/z = 512.1

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 3.31 (s, 3H) ; 3.92 (s, 2H) ; 4.12 (s, 2H) ; 6.75-6.98 (m, 6H) ; 7.13 (m, 1H) ; 7.23 (m, 1H) ; 7.38 (m, 1H) ; 7.53 (d, 1H, J = 8.49 Hz).



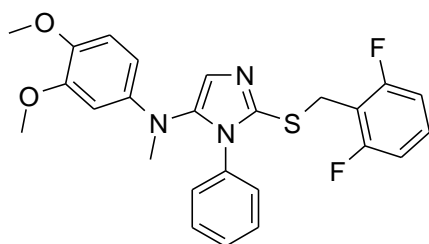
Step 6 : [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dichloro-phenyl)-methyl-amine (**30**)

The titled product is obtained as an orange powder (143 mg, 44%), following Procedure E, using 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-(3,4-dichloro-phenyl)-*N*-methyl-acetamide (**30e**) (334 mg, 0.65 mmol).

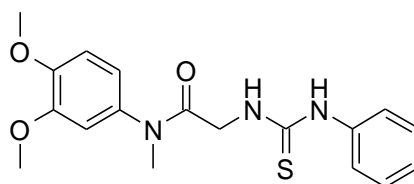
MS $[M+H]^+$ m/z = 496.0.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2,92 (s, 3H) ; 4,19 (s, 2H) ; 6,45 (dd, J = 3.05 Hz, J = 8.91 Hz, 1H); 6,72 (d, J = 2.96Hz, 1H) ; 6,87 (t, J = 7.71Hz, 1H) ; 6,82-6,95 (m, 6H) ; 7,05 (s, 1H) ; 7,2 (d, J = 2.57Hz, 1H) ; 7,22 (d, J = 2.57Hz, 1H).

^{13}C -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 25.8 ; 39.6 ; 111.4 (m) ; 112.5 ; 113.5 (t, $J = 19.4$ Hz) ; 114.5 ; 116.3 (d, $J = 23.1$ Hz) ; 121.7 ; 125.6 ; 129.0 (d, $J = 8.8$ Hz) ; 129.3 (t, $J = 10.3$ Hz) ; 130.4 ; 132.9 ; 137.4 ; 139.5 ; 148.0 ; 161.2 (dd, $J = 250.0$ Hz, $J = 7.3$ Hz) ; 162.5 (d, $J = 249.9$ Hz).



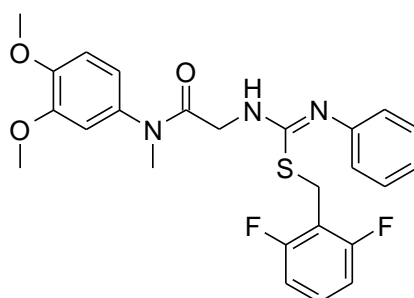
Composé 31



Step 4: N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-N-methyl-2-(3-phenyl-isothioureido)-acetamide (**31a**)

Phenylisothiocyanate (159.5 μL , 1.33 mmol) and TEA (216 μL , 1.60 mmol) are added in a 100 mL flask in 2 mL Ethanol. Residue from [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]ammonium formate (**14b**) (400 mg, 1.33 mmol) is dissolved in 16 mL of ethanol, TEA (180 μL , 1.33 mmol) is added, and the mixture is added dropwise at r.t. After the addition, the reaction is over. Reaction mixture is evaporated to dryness, and purified by flash chromatography (pure cyclohexane to DCM/MeOH 99.5/0.5), to give the titled product as a yellowish residue (162 mg, 34 %).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 359.9$



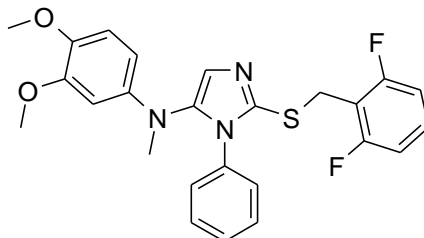
Step 5: 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-phenyl-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**31b**)

The titled product was obtained as yellowish solid (183 mg, 84%), without purification, following Procedure C, using N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-N-methyl-2-(3-phenyl-

isothioureido)-acetamide (**31a**) (162 mg, 450 μmol) and 2-Bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (93 mg, 450 μmol).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 486.0

^1H -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 3.27 (s, 3H) ; 3.81-3.87 (m, 8H) ; 4.12 (s, 2H) ; 6.68-7.21 (m, 11H).



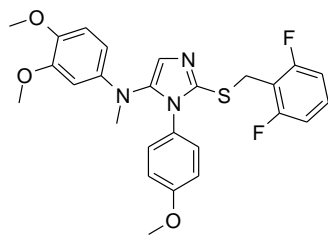
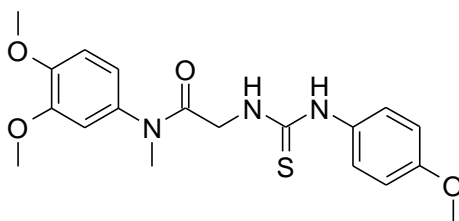
Step 6: [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-phenyl-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**31**)

2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-phenyl-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**31b**) (183 mg, 0.38 mmol) was dissolved in 3.8 mL of ethyl acetate. DIEA (395 μL , 2.26 mmol), and T3P in EtOAc (666 μL , 1.13 mmol) were then added. The mixture was heated with microwave at 150°C for 10 min. Reaction mixture was then diluted with EtOAc, washed by an aqueous saturated solution of NaHCO_3 , and by brine. Organic phase was then dried over Na_2SO_4 and evaporated. Residue was then purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 85/15), and then again by flash chromatography (cHex/DCM 1/1 to DCM/ MeOH 99/1) to give the titled product as a reddish solid (21 mg, 11%).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 467.9

^1H -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 2.90 (s, 3H) ; 3.80 (s, 3H) ; 3.82 (s, 3H) ; 4.18 (s, 2H) ; 6.17 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.8 Hz) ; 6.31 (d, 1H, J = 2.8 Hz) ; 6.70-6.83 (m, 3H) ; 6.99-7.04 (m, 3H) ; 7.18 (m, 1H) ; 7.25-7.32 (m, 3H).

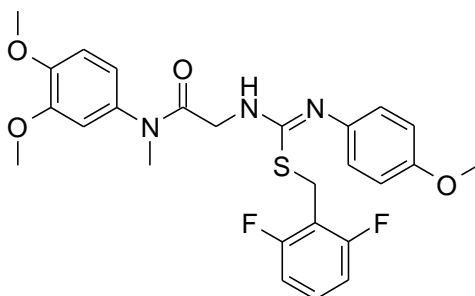
^{13}C -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 25.7 ; 40.0 ; 55.9 ; 56.5 ; 99.8 ; 105.3 ; 111.3 (m) ; 112.4 ; 113.6 (t, J = 19.4 Hz) ; 124.2 ; 127.3 ; 128.7 ; 128.9 ; 129.1 (t, J = 9.9 Hz) ; 134.9 ; 138.3 ; 139.5 ; 142.6 ; 143.3 ; 149.6 ; 161.3 (dd, J = 249.8 Hz, J = 7.4 Hz).

**Composé 32**

Step 4: N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-methoxy-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**32a**)

4-methoxyphenylisothiocyanate (184.0 μL , 1.33 mmol) and TEA (216 μL , 1.60 mmol) were added in a 100 mL flask in 2 mL Ethanol. [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]ammonium formate (**14b**) (400 mg, 1.33 mmol) was dissolved in 16 mL of ethanol, TEA (180 μL , 1.33 mmol) was added, and the mixture was added dropwise at room temperature. After the addition, the reaction was over. Reaction mixture was evaporated to dryness, and purified by flash chromatography (pure cyclohexane to DCM/MeOH 99/1), to give the titled product as a yellowish powder (157 mg, 30%).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 389.9

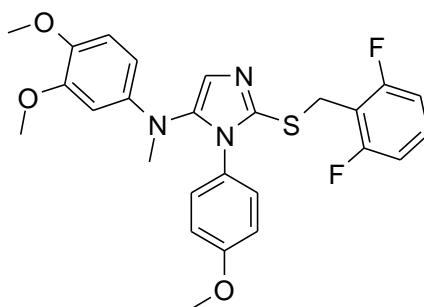


Step 5: 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-methoxy-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**32b**)

The titled product was obtained as an orange solid (170 mg, 82%) without purification, following Procedure C, using N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-methoxy-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**32a**) (157 mg, 400 μmol) and 2-Bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (83mg, 400 μmol).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 516.0

^1H -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 3.28 (s, 3H) ; 3.71 (s, 3H) ; 3.82-3.88 (m, 8H) ; 4.12 (s, 2H) ; 6.70-6.85 (m, 9H) ; 7.17 (m, 1H).



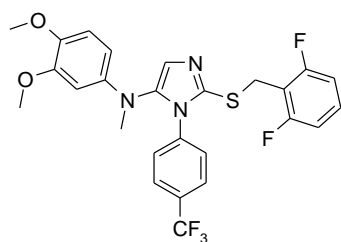
Step 6: [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-methoxy-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**32**)

2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-methoxy-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**32b**) (170 mg, 0.33 mmol) was dissolved in 3.3 mL of ethyl acetate. DIEA (346 μ L, 1.98 mmol), and T3P® in EtOAc (583 μ L, 0.98 mmol) were then added. The mixture was heated with microwave at 150°C for 10 min. Reaction mixture was then diluted with EtOAc, washed with an aqueous saturated solution of NaHCO₃, and brine. Organic phase was then dried over Na₂SO₄ and evaporated. Residue was then purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 85/15), to give the titled product a reddish solid (77 mg, 46%).

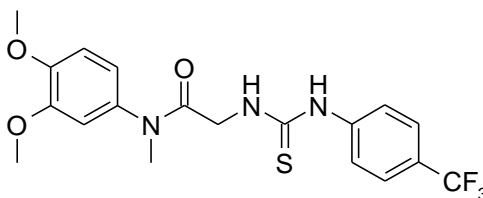
MS [M+H]⁺ m/z = 498.0

¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 2.91 (s, 3H) ; 3.77 (s, 3H) ; 3.80-3.81 (m, 6H) ; 4.17 (s, 2H) ; 6.16 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.8 Hz) ; 6.30 (d, 1H, J = 2.7 Hz) ; 6.70-6.83 (m, 5H) ; 6.93 (m, 2H) ; 7.01 (s, 1H) ; 7.18 (m, 1H).

¹³C-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 25.6 ; 39.9 ; 55.4 ; 55.9 ; 56.5 ; 99.6 ; 105.1 ; 111.2 (m) ; 112.4 ; 113.6 (t, J = 19.6 Hz) ; 114.1 ; 124.2 ; 127.5 ; 128.5 ; 129.1 (t, J = 10.4 Hz) ; 138.6 ; 139.6 ; 142.4 ; 143.4 ; 149.5 ; 159.5 ; 161.2 (dd, J = 250.1 Hz, J = 7.9 Hz).



Composé 33



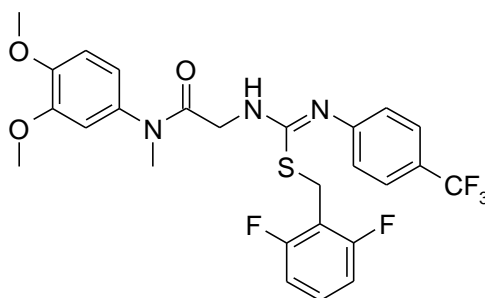
Step 4: N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-N-methyl-2-[3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-isothioureido]-acetamide (**33a**)

4-(trifluoromethyl)phenylisothiocyanate (332 mg, 1.63 mmol) and TEA (264 μ L, 1.96 mmol) were added in a 100 mL flask in 2 mL Ethanol. [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]ammonium formate (**14b**) (490 mg, 1.63 mmol) was dissolved in 18 mL of ethanol, TEA

(220 μL , 1.63 mmol) was added and the mixture was added dropwise at r.t. After the addition, the reaction was over. Reaction mixture was evaporated to dryness, and purified by flash chromatography (pure cyclohexane to cHex/EtOAc 6/4), to give the titled product as a yellowish powder (352 mg, 50%).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 427.9

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) : δ (ppm) 3.18 (s, 3H) ; 3.78 (s, 3H) ; 3.79 (s, 3H) ; 4.02 (d, 2H, J = 3.8 Hz) ; 6.93 (dd, 1H, J = 2.2 Hz, J = 8.5 Hz) ; 7.01-7.06 (m, 2H) ; 7.65 (d, 2H, J = 8.6 Hz) ; 7.80 (d, 2H, J = 8.6 Hz) ; 8.08 (s, 1H) ; 10.3 (s, 1H).

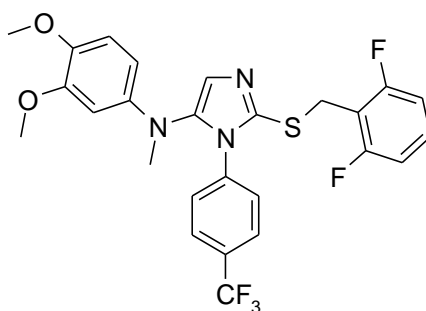


Step 5: 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**33b**)

The titled product was obtained as an orange solid (438 mg, 96 %) without purification, following Procedure C, using N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-N-methyl-2-[3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-isothioureido]-acetamide (**33a**) (352 mg, 820 μmol) and 2-Bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (170 mg, 820 μmol).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 554.0

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) : δ (ppm) 3.16 (s, 3H) ; 3.68 (s, 3H) ; 3.76 (m, 5H) ; 4.21 (s, 2H) ; 6.77-6.88 (m, 3H) ; 6.95-6.99 (m, 2H) ; 7.05-7.11 (m, 3H) ; 7.39 (m, 1H) ; 7.49 (d, 2H, J = 8.4 Hz).



Step 6: [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**33**)

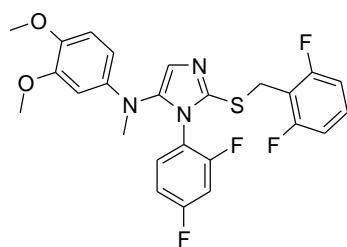
2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**33b**) (438 mg, 0.79 mmol) was dissolved in 8 mL of ethyl acetate. DIEA (829 μL , 4.75 mmol), and T3P® in EtOAc (1.40 mL, 2.37 mmol) were then added. The mixture was heated with microwave at 150°C for 10 min. Reaction mixture was then diluted with EtOAc, washed by an aqueous saturated solution of NaHCO_3 , and by brine.

Organic phase was then dried over Na_2SO_4 and evaporated. Residue was then purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 85/15), to give the titled compound as an orange solid (166 mg, 39 %).

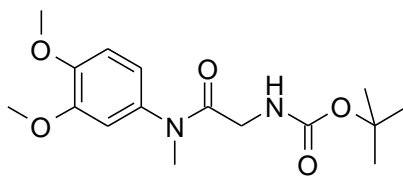
MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 535.9$

^1H -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 2.92 (s, 3H) ; 3.80 (s, 3H) ; 3.83 (s, 3H) ; 4.16 (s, 2H) ; 6.19 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.7$ Hz, 1H) ; 6.31 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H) ; 6.72 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H) ; 6.79 (m, 2H) ; 7.06 (s, 1H) ; 7.13 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H) ; 7.18 (m, 1H) ; 7.53 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H).

^{13}C -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 26.3 ; 40.3 ; 56.0 ; 56.5 ; 100.2 ; 106.0 ; 111.4 (m) ; 112.5, 113.5 (t, $J = 19.3$ Hz) ; 123.7 (q, $J = 271.3$ Hz) ; 126.1 (q, $J = 10.1$ Hz) ; 130.6 (q, $J = 32.6$ Hz) ; 137.9 ; 138.0 ; 139.8 ; 143.0 ; 149.7 ; 161.2 (dd, $J = 250.0$ Hz, $J = 7.4$ Hz).



Composé 34

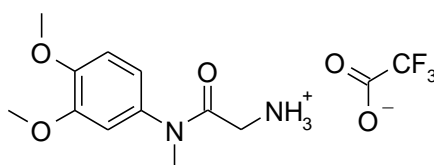


Step 2': tert-butyl N-[2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (34a**)**

In a 250 mL flask was added (3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**8a**) (903 mg, 5.405 mmol) in 4mL of EtOAc . Then 2-(tert-butoxycarbonylamino)acetic acid (1136 mg, 6.486mmol), T3P (4.777 ml, 5159 mmol) and DIEA (2.832 mL, 16.21 mmol) were added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature. Then reaction mixture was diluted with ethyl acetate, washed with water, saturated NaHCO_3 aq and brine. The organic phase was dried over MgSO_4 , and evaporated to dryness, to give 1.77g of reddish powder corresponding to the expected product (100%).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 325.0$

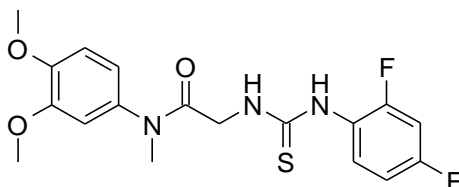
^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm) 1.42 (s, 9H); 3.27 (s, 3H); 3.68 (s, 2H); 3.89 (m, 6H); 6.68 (d, 1H, $J=2.4$ Hz); 6.76 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz) ; 6.86 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz)



Step 3': [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl] ammonium; 2,2,2-trifluoroacetate (34b**)**

In a 50 mL flask tert-butyl N-[2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (**34a**) (1770 mg, 5.458mmol) was dissolved in 13.6 mL of DCM. TFA (5.526mL, 72.21mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 15 minutes. Solvent was evaporated to dryness to give a purple oil, corresponding to the expected product. Residue was used without further purification in the next step.

MS $[M+H]^+$ m/z = 225.1

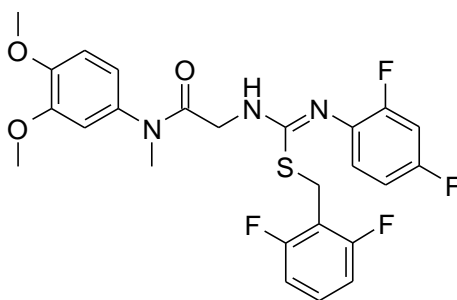


Step 4 : *N*-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-[3-(2,4-difluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-methyl-acetamide (**34c**)

In a 100mL flask were added 2,4-difluoro-1-isothiocyanato-benzene (290mg, 1.698 mmol) and TEA (0.275ml, 2.037 mmol) in 5 mL of Ethanol. To this was added dropwise at room temperature a solution of [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl] ammonium; 2,2,2-trifluoroacetate (**34b**) (574 mg, 1.698mmol) and TEA (0.229 mL, 1.698 mmol) in 20 mL of ethanol. Reaction mixture was then evaporated to dryness. Residue was then purified by flash chromatography (DCM/cHex 1/1 to DCM/ methanol 98/2) to give 335 mg of a yellowish powder corresponding to the expected product (50%).

MS $[M+H]^+$ m/z = 396.1

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.16 (s, 3H) ; 3.76 (s, 3H) ; 3.78 (s, 3H) ; 4.00 (s, 2H) ; 6.90-7.08 (m, 4H) ; 7.29 (m, 1H) ; 7.62 (m, 1H) ; 7.98 (brs, 1H) ; 9.59 (brs, 1H).

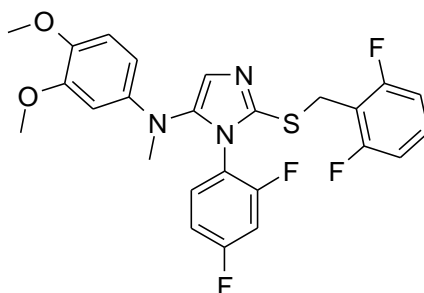


Step 5 : 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(2,4-difluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-(3,4-dimethoxy-phenyl)-*N*-methyl-acetamide (**34d**)

The titled product was obtained as a yellowish oil (413 mg, 93 %) without purification, following Procedure C, using *N*-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-[3-(2,4-difluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-methyl-acetamide (**34c**) (335 mg, 0.85 mmol) and 2-Bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (175 mg, 0.847mmol).

MS $[M+H]^+$ m/z = 522.2

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 3.31 (s, 3H) ; 3.83-3.99 (m, 8H) ; 4.18 (s, 2H) ; 6.65 -6.93 (m, 9H) ; 7.17-7.25 (m, 1H).



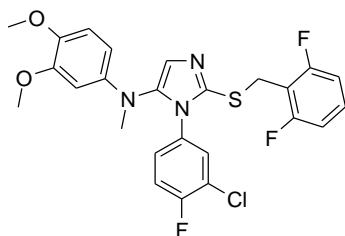
Step 6 : [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(2,4-difluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**34**)

The titled product is obtained as a reddish solid (226 mg, 56%), following Procedure E, using 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(2,4-difluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**34d**) (413 mg, 0.79 mmol).

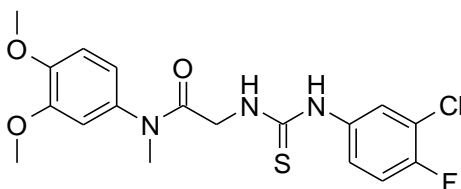
MS $[M+H]^+$ m/z = 504.1

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 3.02 (s, 3H) ; 3.77 (s, 3H) ; 3.80 (s, 3H) ; 4.17 (m, 2H) ; 6.14 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.8 Hz) ; 6.25 (d, 1H, J = 2.8 Hz) ; 6.64-6.76 (m, 2H) ; 6.77-6.87 (m, 4H) ; 7.05 (s, 1H) ; 7.20 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 26.2 ; 40.7 ; 55.8 ; 56.4 ; 100.6 ; 104.9 (dd, J = 26.4 Hz, J = 23.7 Hz) ; 106.2 ; 111.1-112.1 (m) ; 113.7 (t, J = 19.4 Hz) ; 119.1 (dd, J = 13.0 Hz, J = 4.1 Hz) ; 123.8 ; 129.2 (t, J = 10.3 Hz) ; 130.5 (d, J = 10.2 Hz) ; 138.7 ; 140.4 ; 142.7 ; 143.0 ; 149.4 ; 157.8 (dd, J = 255.1 Hz, J = 12.9 Hz) ; 161.2 (dd, J = 250.2 Hz, J = 7.5 Hz) ; 162.9 (dd, J = 252.4 Hz, J = 11.3 Hz).



Composé 35



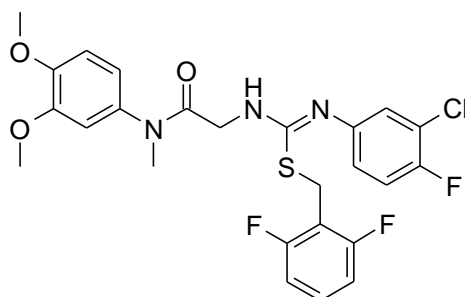
Step 4 : N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-[3-(3-chloro-4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**35a**)

In a 100 mL flask were added 2-Chloro-1-fluoro-4-isothiocyanato-benzene (318mg, 1.697mmol) and TEA (0.275 mL, 2.036 mmol) in 5 mL of Ethanol. To this was added dropwise at room temperature a solution of [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl] ammonium; 2,2,2-trifluoroacetate (**34b**) (574 mg, 1.697mmol) and TEA (0.229 mL, 1.697

mmol) in 20 mL of ethanol. Reaction mixture was then evaporated to dryness and purified by flash chromatography (pure DCM to DCM/MeOH 98/2) to give the titled product as a pale green powder (367 mg, 53 %).

MS $[M+H]^+$ m/z = 412.0.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 3.17 (s, 3H) ; 3.77 (s, 3H) ; 3.79 (s, 3H) ; 4.00 (d, 2H, J = 4.2 Hz) ; 6.93 (dd, 1H, J = 8.4 Hz, J = 2.3 Hz) ; 7.34-7.36 (m, 2H) ; 7.84-7.95 (m, 2H) ; 10.05 (s, 1H).

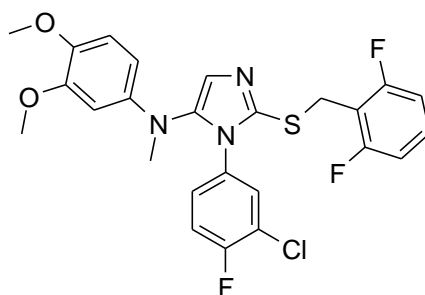


Step 5 : 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(3-chloro-4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**35b**)

The titled product was obtained as an orange oil (238 mg, 99 %) without purification, following Procedure C, using *N*-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-[3-(3-chloro-4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-methyl-acetamide (**35a**) (184 mg, 0.45 mmol) and 2-Bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (92mg, 0.45mmol).

MS $[M+H]^+$ m/z = 538.1

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 3.29 (s, 3H) ; 3.79-3.93 (m, 8H) ; 4.13(s, 2H) ; 6.57-7.00 (m, 9H) ; 7.15-7.27 (m, 1H).



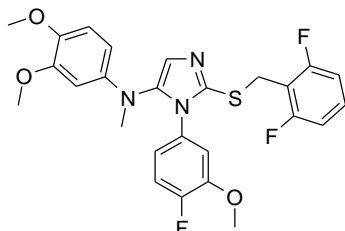
Step 6 : [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(3-chloro-4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**35**)

The titled product is obtained as an orange powder (126 mg, 55%), following Procedure E, using 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(3-chloro-4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-*N*-(3,4-dimethoxy-phenyl)-*N*-methyl-acetamide (**35b**) (238 mg, 0.44 mmol).

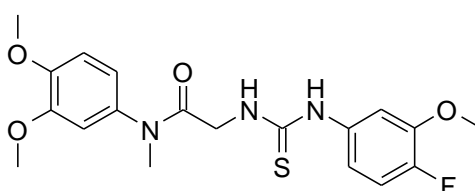
MS $[M+H]^+$ m/z = 520.1

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2.96 (s, 3H) ; 3.80 (s, 3H) ; 3.82 (s, 3H) ; 4.14 (s, 2H) ; 6.15 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.7 Hz) ; 6.71 (d, 1H, J = 8.7 Hz) ; 6.77-6.89 (m, 3H) ; 6.91 (dd, 1H, J = 6.4 Hz, J = 2.5 Hz) ; 7.01 (t, 1H, J = 8.5 Hz) ; 7.03 (s, 1H) ; 7.20 (m, 1H).

^{13}C -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 26.3 ; 40.6 ; 56.0 ; 56.5 ; 100.6 ; 106.5 ; 111.3 (m) ; 112.3 ; 113.6 (t, $J = 19.4$ Hz) ; 116.6 (d, $J = 22.4$ Hz) ; 121.2 (d, $J = 19.1$ Hz) ; 124.0 ; 127.5 (d, $J = 7.7$ Hz) ; 129.3 (t, $J = 10.2$ Hz) ; 129.7 ; 131.4 (d, $J = 3.9$ Hz) ; 137.9 ; 139.9 ; 142.9 ; 143.2 ; 149.7 ; 157.8 (d, $J = 251.7$ Hz) ; 161.1 (dd, $J = 249.7$ Hz, $J = 7.6$ Hz).



Composé 36

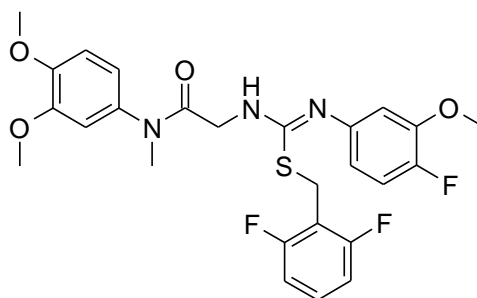


Step 4 : *N*-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-isothioureido]-*N*-methyl-acetamide (**36a**)

In a 25 mL flask, TCDI (133 mg, 0.749 mmol) was dissolved in 3 mL of dioxane. [2-(3,4-dimethoxy-*N*-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl] ammonium; 2,2,2-trifluoroacetate (**34b**) (230 mg, 0.681 mmol) in 3.50 mL of dioxane was then added dropwise. The solution was then stirred at room temperature for 1,5 hours. 4-fluoro-3-methoxy-aniline (106 mg, 0.750 mmol) and TEA (285 μL , 2.04 mmol) were added to the solution. Reaction mixture was stirred at 60°C overnight. Solvent was then removed. Residue was dissolved in EtOAc, and washed with water and aqueous 0.1N HCl solution, dried over MgSO_4 . After evaporation, residue was purified by flash chromatography (pure cHex to cHex/EtOAc 8/2) to give the titled product as an orange solid (136 mg, 49 %).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 408.1$

^1H -NMR ($\text{DMSO } d_6$) : δ (ppm) 3.16 (s, 3H) ; 3.74-3.82 (m, 9H) ; 4.00 (d, 2H, $J = 4.2$ Hz) ; 6.84-6.96 (m, 2H) ; 6.98-7.06 (m, 2H) ; 7.15 (dd, 1H, $J = 11.3$ Hz, $J = 8.7$ Hz) ; 7.37 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 2.2$ Hz) ; 7.77 (brs, 1H) ; 9.91 (s, 1H).

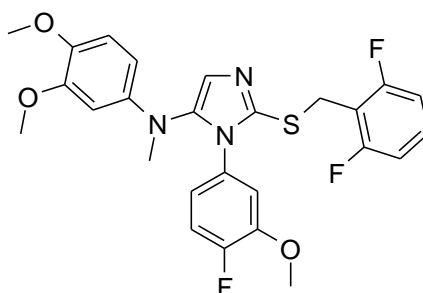


Step 5 : 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**36b**)

The titled product was obtained as a yellowish oil (156 mg, 91%) without purification, following Procedure C, using *N*-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-isothioureido]-*N*-methyl-acetamide (**36a**) (124 mg, 304 μ mol) and 2-Bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (63 mg, 304 μ mol).

MS $[M+H]^+$ m/z = 534.2

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 3.28 (s, 3H) ; 3.78-3.84 (m, 11H) ; 4.11 (brs, 2H) ; 5.82 (s, 1H) ; 6.29 (brs, 1H) ; 6.44 (d, 1H, J = 6.3 Hz) ; 6.61-6.89 (m 6H) ; 7.13-7.26 (m, 1H).



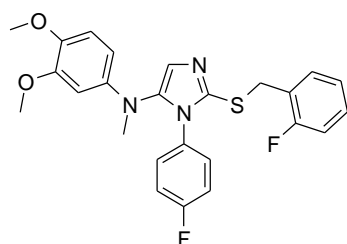
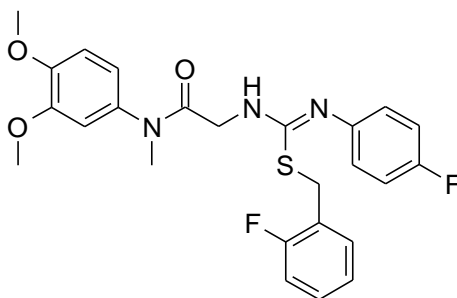
Step 6 : [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**36**)

The titled product is obtained as an orange powder (143 mg, 63%), following Procedure E, using 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-isothioureido]-*N*-(3,4-dimethoxy-phenyl)-*N*-methyl-acetamide (**36b**) (156 mg, 0.28 mmol).

MS $[M+H]^+$ m/z = 516.2

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2.90 (s, 3H) ; 3.54 (s, 3H) ; 3.82 (s, 6H) ; 4.20 (s, 2H) ; 6.18 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.8 Hz) ; 6.33 (d, 1H, J = 2.8 Hz) ; 6.54 (dd, 1H, J = 7.5 Hz, J = 2.4 Hz) ; 6.59-6.64 (m, 1H) ; 6.75 (d, 1H, J = 8.7 Hz) ; 6.78-6.86 (m, 2H) ; 6.98 (dd, 1H, J = 10.8 Hz, J = 8.6 Hz) ; 7.06 (s, 1H) ; 7.14-7.24 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 25.7 ; 39.9 ; 55.9 ; 56.0 ; 56.6 ; 99.7 ; 105.2 ; 111.1-111.4 (m) ; 112.6 ; 112.7 (d, J = 2.4 Hz) ; 113.6 (t, J = 19.4 Hz) ; 115.9 (d, J = 19.6 Hz) ; 119.7 (d, J = 7.3 Hz) ; 124.9 ; 129.2 (t, J = 10.2 Hz) ; 130.9 (d, J = 3.6 Hz) ; 138.6 ; 139.0 ; 142.6 ; 143.5 ; 147.5 (d, J = 11.6 Hz) ; 149.8 ; 152.0 (d, J = 248.9 Hz) ; 161.2 (dd, J = 249.9 Hz, J = 7.7 Hz).

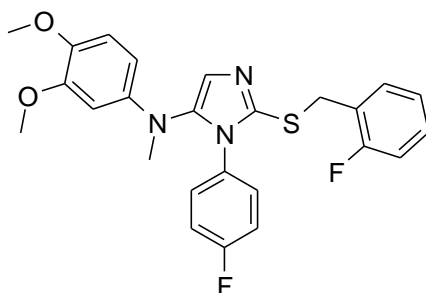
**Composé 37**

Step 5 : N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[2-(2-fluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**37a**)

The titled product was obtained without purification as an oily residue (254 mg, 96%), following Procedure C, using N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**) (195 mg) and 1-(bromomethyl)-2-fluoro-benzene (94 mg).

MS $[M+H]^+$ m/z = 486.0

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 3.16 (s, 3H) ; 3.39-3.76 (m, 8H) ; 4.17 (s, 2H) ; 6.59-6.89 (m, 4H) ; 6.95-7.00 (m, 4H) ; 7.11-7.19 (m, 2H) ; 7.31 (m, 1H) ; 7.41 (m, 1H).



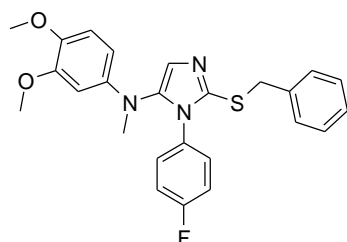
Step 6: (3,4-Dimethoxy-phenyl)-[2-(2-fluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-methyl-amine (**37**)

The titled product was obtained as an orange powder (130 mg, 61%), following Procedure E, using N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[2-(2-fluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**37a**)

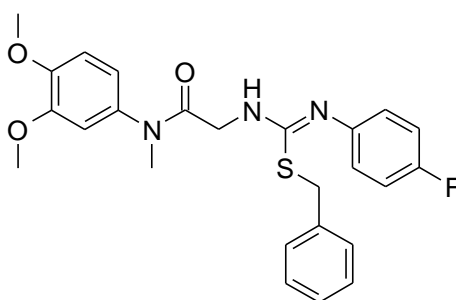
MS $[M+H]^+$ m/z = 468.0

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 3.77 (s, 3H) ; 3.81 (s, 3H) ; 4.27 (s, 2H) ; 6.11 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.7 Hz, 1H) ; 6.22 (d, J = 2.7 Hz, 1H) ; 6.69 (d, J = 8.7 Hz) ; 6.79-6.84 (m, 2H) ; 6.90-7.06 (m, 5H) ; 7.20-7.25 (m, 2H).

^{13}C -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 31.8 ; 40.3 ; 55.9 ; 56.5 ; 100.0 ; 105.8 ; 112.4 ; 115.5 (d, $J = 21.5$ Hz) ; 116.0 (d, $J = 22.8$ Hz) ; 123.8 ; 124.1 ; 124.7 (d, $J = 14.8$ Hz) ; 129.1 ; 129.2 ; 129.4 ; 130.7 ; 131.0 ; 139.1 ; 139.3 ; 142.7 ; 143.1 ; 149.6 ; 160.9 (d, $J = 248.3$ Hz) ; 162.4 (d, $J = 249.8$ Hz)



Composé 38

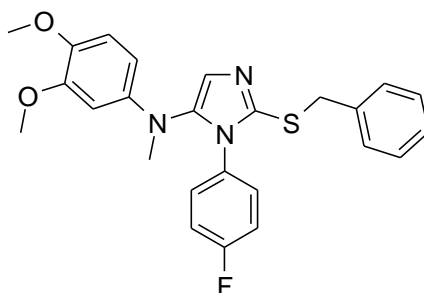


Step 5: 2-[2-Benzyl-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**38a**)

The titled product was obtained without purification as an oily residue (259 mg, 98%), following Procedure C, using N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**) (195 mg) and benzylbromide (85 mg).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 468.0$

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) : δ (ppm) 3.17 (s, 3H) ; 3.69-3.76 (m, 8H) ; 4.14 (s, 2H) ; 6.61 (m, 3H) ; 6.88 (m, 1H) ; 6.95-7.01 (m, 4H) ; 7.22-7.31 (m, 5H).



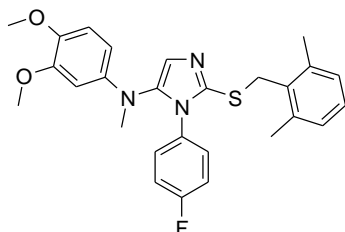
Step 6: [2-Benzylsulfanyl-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**38**)

The titled product was obtained as an orange powder (68 mg, 32%), following Procedure E, using 2-[2-Benzyl-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**38a**) (249 mg).

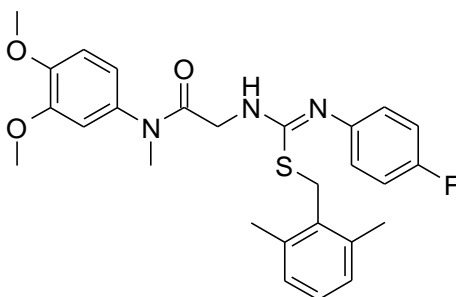
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 450.0$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2.92 (s, 3H) ; 3.75 (s, 3H) ; 3.81 (s, 3H) ; 4.26 (s, 2H) ; 6.09 (dd, $J = 2.8$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H) ; 6.20 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H) ; 6.68 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H) ; 6.74-6.78 (m, 2H) ; 6.89-6.95 (m, 2H) ; 7.04 (s, 1H) ; 7.19-7.29 (m, 5H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 38.7 ; 40.3 ; 55.9 ; 56.5 ; 99.9 ; 105.8 ; 112.4 ; 115.7 ; 115.9 (d, $J = 22.8$ Hz) ; 123.6 ; 127.4 ; 128.5 ; 129.0 ; 129.3 (d, $J = 8.6$ Hz) ; 130.7 ; 137.4 ; 139.2 ; 139.4 ; 142.7 ; 143.1 ; 149.5 ; 162.4 (d, $J = 248.9$ Hz).



Composé 39

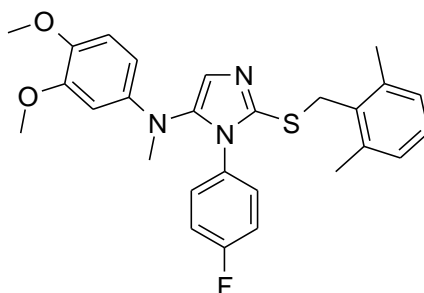


Step 5: N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[2-(2,6-dimethyl-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**39a**)

The titled product was obtained without purification as an oily residue (230 mg, 90%), following Procedure C, using N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**) (195 mg) and 2-(chloromethyl)-1,3-dimethyl-benzene (77 mg).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 496.0$

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) : δ (ppm) 2.25 (s, 6H) ; 3.18 (s, 3H) ; 3.68-3.77 (m, 8H) ; 4.14 (s, 2H) ; 6.69-7.05 (m, 11H).



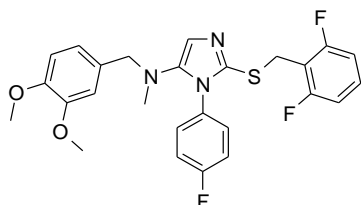
Step 6: (3,4-Dimethoxy-phenyl)-[2-(2,6-dimethyl-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-methyl-amine (**39**)

The titled product was obtained as an orange powder (63 mg, 34 %) following procedure E using N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[2-(2,6-dimethyl-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**39a**) (200 mg).

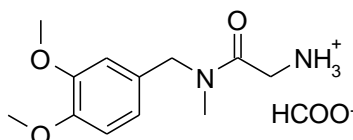
MS $[M+H]^+$ m/z = 478.0

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2.28 (s, 6H) ; 2.95 (s, 3H) ; 3.78 (s, 3H) ; 3.82 (s, 3H) ; 4.34 (s, 2H) ; 6.15 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.7 Hz) ; 6.25 (d, J = 2.8 Hz) ; 6.70 (d, J = 8.7 Hz) ; 6.86-7.05 (m, 8H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 19.6 ; 33.3 ; 40.4 ; 56.0 ; 56.4 ; 100.1 ; 106.1 ; 112.4 ; 115.9 (d, J = 23.0 Hz) ; 123.4 ; 127.5 ; 128.3 ; 129.3 (d, J = 8.7 Hz) ; 130.8 ; 132.4 ; 137.6 ; 139.4 ; 140.0 ; 142.8 ; 143.1 ; 149.6 ; 162.3 (d, J = 250.2 Hz).



Composé 40



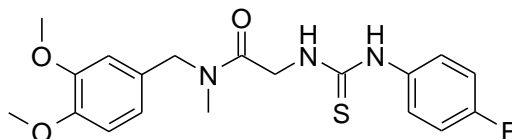
Step 2 & 3: [(3,4-dimethoxy-benzyl)-methyl-carbamoyl]-methyl-ammonium formate (**40a**)

In a 100mL flask was introduced a solution of 1.053 mL of (3,4-Dimethoxy-benzyl)-methyl-amine and 2.74 mL of DIEA in 13 mL of DCM (dried over Na_2SO_4). The solution was stirred at 0°C . Then, a solution of 0.843 mL of chloroacetyl chloride in 13 mL of DCM (dried over Na_2SO_4) was added dropwise in the flask. The mixture was then evaporated to dryness to give a brown residue. Conversion was considered to be 100% for the next reaction.

The obtained residue was dissolved in 9 mL of Ethanol 95°C and added dropwise in a 250 mL flask containing 100 mL of aqueous ammonia at 65°C . After the addition, heating was stopped. The mixture was evaporated to dryness. The residue was then dissolved in DCM, and extracted several times by an aqueous solution of HCOOH 1M. During this extraction, a precipitate appeared and was filtered. The filtrate was then evaporated to dryness, and the residue was triturated in acetonitrile. The supernatant was evaporated to dryness, to give

the titled product as a pale brown oily residue (90% UV_{215nm} purity) (1.51 g, 90% yield over the 2 steps).

MS $[M+H]^+$ m/z = 239.0

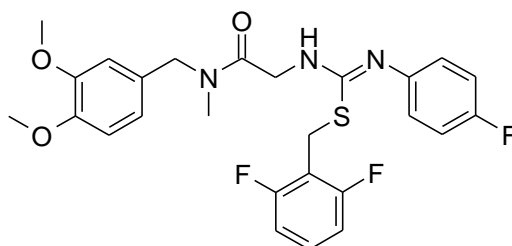


Step 4: N-(3,4-Dimethoxy-benzyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-thioureido]-N-methyl-acetamide (40b)

732 mg of 4-fluorophenylisothiocyanate and 774 μ L of TEA were added in a 250 mL flask in 4 mL Ethanol. [(3,4-dimethoxy-benzyl)-methyl-carbamoyl]-methyl-ammonium formate (**40a**) (1.51 g, 4.78 mmol) was dissolved in 60 mL of ethanol and 645 μ L of TEA were then added. This solution was added dropwise at r.t. After the addition, the reaction was over. Reaction mixture was evaporated to dryness, and purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 6/4) to give the titled product as a yellowish solid (880 mg, 47% yield).

MS $[M+H]^+$ m/z = 391.9

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD- d_4) : δ (ppm) : 2.91-2.99 (m, 3H) ; 3.81-3.84 (m, 6H) ; 4.47-4.58 (m, 4H) ; 6.81-6.98 (m, 3H) ; 7.08-7.15 (m, 2H) ; 7.39-7.45 (m, 2H)

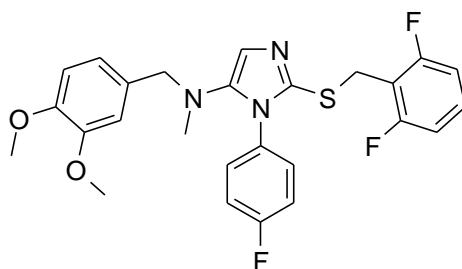


Step 5: 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-benzyl)-N-methyl-acetamide (40c)

The titled product was obtained as an oily residue (207 mg, 58%), following Procedure C, using N-(3,4-Dimethoxy-benzyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-thioureido]-N-methyl-acetamide (**40b**) (0,300 g) and 2-Bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (77 mg).

MS $[M+H]^+$ m/z = 518.0

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) : 2.85 (m, 3H) ; 3.65 (m, 3H) ; 3.70 (s, 3H) ; 4.15 (m, 2H) ; 4.23 (m, 2H) ; 4.47 (m, 2H) ; 6.64 (m, 2H) ; 6.77-6.89 (m, 4H) ; 6.99 (m, 2H) ; 7.09 (m, 2H) ; 7.39 (m, 1H).



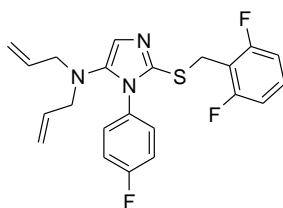
Step 6: [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-benzyl)-methyl-amine (**40**)

The titled product was obtained as a yellowish powder (91 mg, 47 %) following procedure E using 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-benzyl)-N-methyl-acetamide (**40c**) (200 mg).

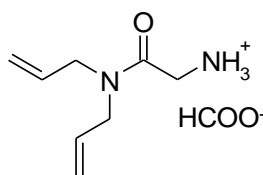
MS $[M+H]^+$ m/z = 499.9

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2.48 (s, 3H) ; 3.68 (s, 2H) ; 3.77 (s, 3H) ; 3.86 (s, 3H) ; 4.10 (s, 2H) ; 6.37 (d, 1H, J = 1.9 Hz) ; 6.56 (dd, 1H, J = 8.2 Hz, J = 1.9 Hz) ; 6.74 (d, 1H, J = 8.1 Hz) ; 6.77-6.85 (m, 3H) ; 7.10-7.22 (m, 5H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 26.0 ; 40.4 ; 55.8 ; 55.9 ; 60.6 ; 110.6 ; 111.1 ; 111.3 ; 113.5 (t, J = 19.0 Hz) ; 116.0 (d, J = 22.1 Hz) ; 117.6 ; 121.0 ; 129.1 (t, J = 10.1 Hz) ; 129.7 ; 129.9 (d, J = 8.5 Hz) ; 131.6 (d, J = 2.3 Hz) ; 136.4 ; 145.8 ; 148.3 ; 148.8 ; 161.2 (dd, J = 250.0 Hz, J = 7.7 Hz) ; 162.3 (d, J = 248.9 Hz).



Composé 43



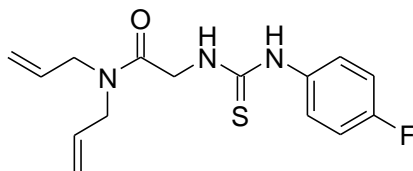
Step 2 & 3: diallylcarbamoylmethyl-ammonium formate (**43a**)

In a 500 mL flask was introduced a solution of 5.1 mL of diallylamine and 21 mL of DIEA in 100 mL of DCM (dried over Na_2SO_4). The solution was stirred at 0°C. Then, a solution of 6.4 mL of chloroacetyl chloride in 100 mL of DCM (dried over Na_2SO_4) was added dropwise in the flask. The mixture was then evaporated to dryness to give a brown residue. Conversion is considered to be 100% for the next reaction.

The obtained residue was dissolved in 66 mL of Ethanol 95°, and added dropwise in a 1 L flask containing 380 mL of aqueous ammonia at 65°C. After the addition, heating was stopped. The mixture was evaporated to dryness. The residue was then dissolved in DCM

and extracted several times by an aqueous solution of HCOOH 1M. During this extraction, a precipitate appeared and was filtered. The filtrate was then evaporated to dryness, and the residue was triturated in acetonitrile. The supernatant was evaporated to dryness, to give the expected product as a brown oily residue. Yield was considered to be total.

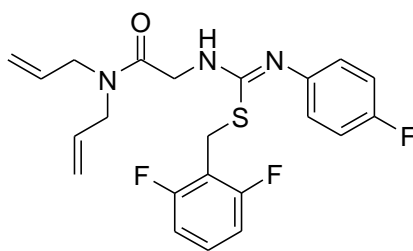
MS $[M+H]^+$ m/z = 155.0



Step 4: *N,N*-Diallyl-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-thioureido]-acetamide (43b**)**

3.06 g of 4-fluorophenylisothiocyanate and 3.2 mL of TEA were added in a 1L flask in 25 mL Ethanol. Residue corresponding to diallylcarbamoylmethyl-ammonium formate (**43a**) (20.0 mmol) was dissolved in 50 mL of ethanol. 25 mL of the obtained solution were diluted with 200mL of ethanol, and 2.7 mL of TEA were then added. This solution was added dropwise at r.t. After the addition, the reaction was over. Reaction mixture was then evaporated to dryness, and diluted by EtOAc. Organic phase was washed with aqueous 0.1M HCl, and brine. An emulsion was observed. Aqueous phase was removed, and extracted with dichloromethane, to give 190 mg of a reddish residue. The emulsion (organic phase plus part of the aqueous phase) was evaporated. Addition of a mixture of ethanol and isopropanol lead to a precipitate formation. This precipitate was filtered, and filtrate was evaporated to give 6.3 g of a dark residue. LCMS analysis showed it was mainly constituted of the expected product. This residue will enter the next step without further purification, considering a 70 % yield (80% purity).

MS $[M+H]^+$ m/z = 308.0



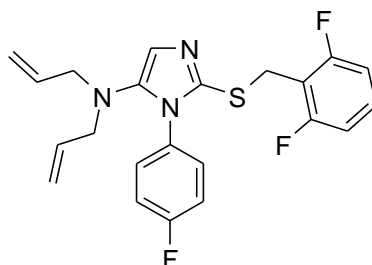
Step 5: *N,N*-Diallyl-2-[2-(2,6-difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-acetamide (43c**)**

In a 100 mL flask were added residue corresponding to *N,N*-Diallyl-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-thioureido]-acetamide (**43b**) (1,5 g), Potassium Carbonate (553 mg), sodium Iodide (300 mg) and 20 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 10 min, and 2-(bromomethyl)-1,3-difluoro-benzene (828 mg) was then added. The suspension was stirred at room temperature for 14 hours. The medium was then evaporated, residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine, organic phase was dried over Na₂SO₄ and

evaporated. Residue was purified by flash chromatography (pure cHex to cHex/EtOAc 9/1) to give the titled product as a yellowish oil (1.49 g, 72 % yield over the 4 first steps).

MS $[M+H]^+$ m/z = 434.0

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 3.91 (m, 4H) ; 4.10 (d, 2H, J = 5.07 Hz) ; 4.24 (s, 2H) ; 5.07-5.22 (m, 4H) ; 5.65-5.93 (m, 2H) ; 6.64 (m, 2H) ; 6.80-7.16 (m, 5H) ; 7.39 (m, 1H).



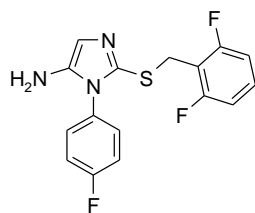
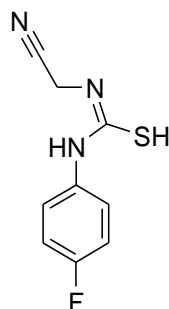
Step 6: Diallyl-[2-(2,6-difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-amine
(43)

The titled product was obtained as a reddish solid (1.11 g, 69%) following procedure D using *N,N*-Diallyl-2-[2-(2,6-difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-acetamide (43c) (1.49 g).

MS $[M+H]^+$ m/z = 416.0

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 3.32 (Dt, 4H, J = 6.3 Hz, J = 1.1 Hz) ; 4.06 (s, 2H) ; 4.99-5.11 (m, 4H) ; 5.60 (Ddt, 2H, J = 16.9 Hz, J = 10.5 Hz, J = 6.4 Hz) ; 6.71 (s, 1H) ; 6.78 (m, 2H) ; 7.02-7.24 (m, 5H).

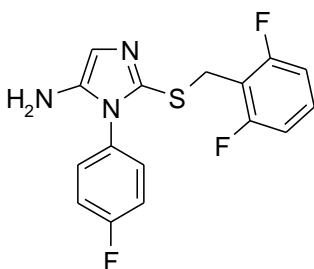
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 26.0 ; 55.6 ; 111.2 (m) ; 115.9 (d, J = 22.8 Hz) ; 118.2 ; 119.4 ; 129.1 (t, J = 10.1 Hz) ; 129.7 (d, J = 8.6 Hz) ; 133.7 ; 143.4 ; 161.2 (dd, J = 249.9 Hz, J = 7.9 Hz) ; 162.2 (d, J = 249.9 Hz).

**Composé 44****1-Cyanomethyl-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureia (44a)**

2-aminoacetonitrile hydrochloride (725 mg, 7.83 mmol) and TEA (1090 μ L, 7.83 mmol) were added in 12 mL of DMF. Then a solution of 4-fluoro-phenylisothiocyanate (1,00 g, 6.53 mmol) in 2 mL of DMF was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min, then cooled down to 0°C. After addition of roughly 60 mL water, a precipitate was obtained. The mixture was stirred at 0°C for 30 min and filtrated. The purple crystals obtained correspond to the titled product (1.09g, 80 %).

MS $[M+H]^+$ m/z = 209.9

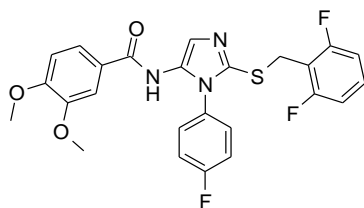
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ (ppm) 4.49 (d, 2H, J = 5.5 Hz) ; 7.20 (t, 2H, J = 8.7 Hz) ; 7.38 (Dd, 2H, J = 8.6 Hz, J = 5.0 Hz) ; 8.03 (brs, 1H) ; 10.02 (s, 1H).

**2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-ylamine (44)**

In a 50 mL flask were added 1-Cyanomethyl-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureia (**44a**) (1,09 g, 5.21 mmol), 10 mL of dry acetonitrile, NaI (390mg, 2.60 mmol), 2-Bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (1.08 g,) and DIEA (891 μ L, 5.21 mmol). Reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min. Reaction mixture was then diluted with 20mL EtOAc, washed with 10 mL water and 10 mL brine, dried over Na_2SO_4 and evaporated.

MS $[M+H]^+$ m/z = 335.9

N.B. : All attempts to purify that compound were unsuccessful, due to its instability. Next step (to obtain compound **45**) has been performed on the crude residue.

**Composé 45**

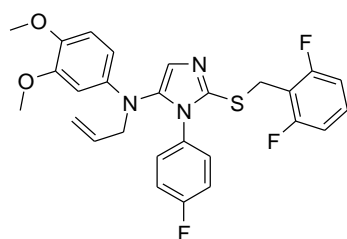
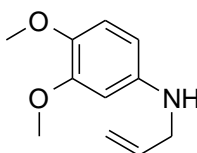
N-[2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-3,4-dimethoxybenzamide (**45**)

3,4-dimethoxybenzoic acid (130 mg, 0.72mmol) was dissolved in 752μL of a mixture of thionyl chloride (SOCl₂) and DCM (2/8, V/V). After one hour stirring at room temperature, it was evaporated. Then 2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-ylamine (**44**) (200mg, 0.36 mmol) in 1.8 ml dry THF and Pyridine (57.9 μL, 0.72 mmol) were added over the residue, and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. Reaction mixture was then evaporated, dissolved in EtOAc, washed with water, saturated NaHCO_{aq} and brine. Organic phase was dried over Na₂SO₄ and evaporated. Residue was purified by Flash Chromatography (first cHex to cHex/ EtOAc 7/3 and then cHex/ DCM 1/1 to DCM/MeOH 98/2) to give a reddish solid corresponding to the pure titled product (56 mg, 31%).

MS [M+H]⁺ *m/z* = 499.8

¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 3.87 (s, 3H) ; 3.89 (s, 3H) ; 4.13 (s, 2H) ; 6.75-6.87 (m, 3H) ; 7.05-7.26 (m, 7H) ; 7.37 (d, 1H, *J* = 1.95 Hz) ; 8.15 (s, 1H).

¹³C-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 26.0 ; 56.1 ; 110.4 ; 110.9 ; 111.2-111.6 (m) ; 113.2 (t, *J* = 19.2 Hz) ; 116.6 (d, *J* = 23.0 Hz) ; 120.1 ; 123.4 ; 125.5 ; 129.3 ; 129.5 (t, *J* = 10.2 Hz) ; 129.7 (d, *J* = 8.8 Hz) ; 130.1 (d, *J* = 3.3 Hz) ; 138.7 ; 149.2 ; 152.6 ; 161.3 (dd, *J* = 254.5 Hz, *J* = 3.7 Hz) ; 162.9 (d, *J* = 250.5 Hz) ; 165.9.

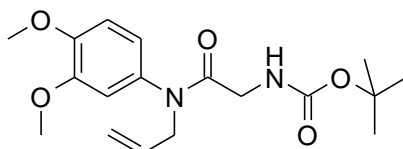
**Composé 46****Step 1': N-allyl-3,4-dimethoxy-aniline (**46a**)**

Allyl bromide (0.519 mL, 6.0 mmol) was added dropwise to a solution of 3,4-dimethoxyaniline (919 mg, 6.0 mmol) and K₂CO₃ (1.99 g, 14.4 mmol) in DMF (15 mL). The solution was heated to 80 °C and stirred at this temperature overnight. The reaction mixture was then filtered, washed with H₂O (3x10 mL) and extracted with EtOAc (2x10 mL). The combined organic extracts were washed with brine (15 mL), dried over Na₂SO₄ and

concentrated in vacuo. Residue was purified by flash chromatography (pure cHex to cHex/EtOAc 9/1 to cHex/EtOAc 8/2) to give the titled product as a pale yellowish oil (587 mg, 51 %)

MS $[M+H]^+$ m/z = 194.0

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 3.74 (Dt, 2H, J = 5.5 Hz, J = 1.5 Hz) ; 3.81 (s, 3H) ; 3.84 (s, 3H) ; 5.17 (Dq, 1H, J = 10.3 Hz, J = 1.5 Hz) ; 5.29 (Dq, 1H, J = 17.2 Hz, J = 1.6 Hz) ; 5.98 (Ddt, 1H, J = 17.2 Hz, J = 10.6 Hz, J = 5.3 Hz) ; 6.18 (dd, 1H, J = 8.5 Hz, J = 2.6 Hz) ; 6.29 (d, 1H, J = 2.6 Hz) ; 6.75 (d, 1H, J = 8.5 Hz).

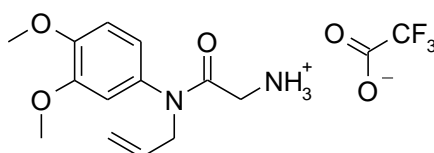


Step 2': tert-butyl N-[2-(N-allyl-3,4-dimethoxy-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (**46b**)

In a 100mL flask were added N-allyl-3,4-dimethoxy-aniline (**46a**) (587.0 mg, 3.04 mmol), 6 mL Ethyl acetate, Boc-Gly-OH (638.6 mg, 3.65 mmol), $^{\text{®}}$ T3P (2.69 mL, 4.56 mmol), and DIEA (1.59 mL, 9.11 mmol). Reaction mixture was then stirred at room temperature for 2 hour. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate, washed with saturated NaHCO_3 aq and brine, and the organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated to give the titled product as a yellowish viscous oil (1.07 g, 100 %).

MS $[M+H]^+$ m/z = 351.1

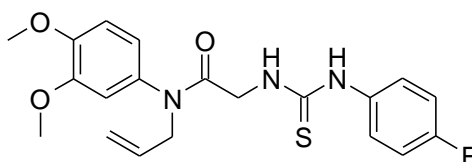
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 1.41 (s, 9H) ; 3.66 (d, 2H, J = 4.2 Hz) ; 3.85 (s, 3H) ; 3.88 (s, 3H) ; 4.26 (d, 2H, J = 6.4 Hz) ; 5.04-5.19 (m, 2H) ; 5.39 (brs, 1H) ; 5.85 (Ddt, 1H, J = 16.8 Hz, J = 10.3 Hz, J = 6.5 Hz) ; 6.64 (d, 1H, J = 2.2 Hz) ; 6.72 (dd, 1H, J = 8.4 Hz, J = 2.4 Hz) ; 6.83 (d, 1H, J = 8.4 Hz).



Step 3': [2-(N-allyl-3,4-dimethoxy-anilino)-2-oxo-ethyl]ammonium;2,2,2-trifluoroacetate (**46c**)

Tert-butyl N-[2-(N-allyl-3,4-dimethoxy-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (**46b**) (1.07 g, 3.05 mmol) was dissolved in 7 mL of dichloromethane. 3 mL of TFA were then gently added and reaction mixture was then stirred at room temperature for 30 min. Reaction mixture was then evaporated to dryness, to give a pale orange oil, corresponding to the titled product. This oil will enter the next step without further purification. Yield was considered to be 100%.

MS $[M+H]^+$ m/z = 251.1

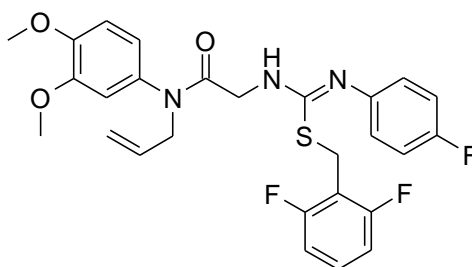


Step 4: N-Allyl-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-acetamide (**46d**)

4-fluorophenylisothiocyanate (468 mg, 3.05 mmol) and TEA (494 μ L, 3.66 mmol) were added in a 250 mL flask in 9 mL Ethanol. [2-(N-allyl-3,4-dimethoxy-anilino)-2-oxo-ethyl]ammonium;2,2,2-trifluoroacetate (**46c**) (3.05 mmol) was dissolved in 31 mL of ethanol, TEA was added until pH was over 8 and the mixture was added dropwise at r.t. After the addition, the reaction was over. After one hour stirring at room temperature, a precipitate has appeared. It was then filtered, to give a white powder of the powder corresponding to the titled product (1.09 g, 88%).

MS $[M+H]^+$ m/z = 404.1

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 3.75 (s, 3H) ; 3.78 (s, 3H) ; 4.01 (d, 2H, J = 4.4 Hz) ; 4.23 (d, 2H, J = 5.8 Hz) ; 5.01-5.20 (m, 2H) ; 5.80 (Ddt, 1H, J = 16.0 Hz, J = 11.5 Hz, J = 5.7 Hz) ; 6.87 (dd, 1H, J = 7.26 Hz, J = 1.11 Hz) ; 6.93-7.05 (m, 2H) ; 7.09-7.21 (m, 2H) ; 7.38-7.51 (m, 2H) ; 7.74 (brs, 1H) ; 9.89 (s, 1H).

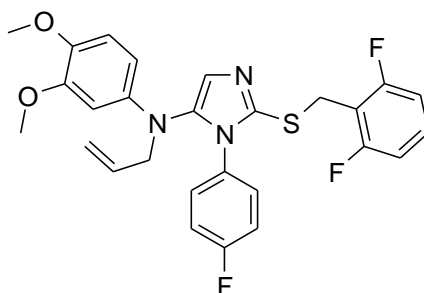


Step 5: N-Allyl-2-[2-(2,6-difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-acetamide (**46e**)

In a 25mL flask were added N-Allyl-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-acetamide (**46d**) (400 mg, 0.99 mmol), Potassium Carbonate (137 mg, 0.99 mmol), sodium Iodide (74 mg, 0.50 mmol), and 5 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 10 min, and 2-(bromomethyl)-1,3-difluoro-benzene (205 mg, 0.99 mmol) was then added. The suspension was stirred at room temperature for overnight. The medium was then evaporated, residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine, organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness to give 543 mg of an orange solid corresponding to the titled product (100 %).

MS $[M+H]^+$ m/z = 530.2

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 3.81-3.92 (m, 8H) ; 4.13 (brs, 2H) ; 4.29 (d, 2H, J = 6.3 Hz) ; 5.07-5.21 (m, 2H) ; 5.78-5.96 (m, 1H) ; 6.63-6.95 (m, 10H) ; 7.21 (m, 1H).



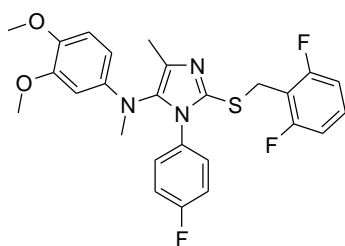
Step 6: Allyl-[2-(2,6-difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-amine (**46**)

In a microwave tube were introduced N-Allyl-2-[2-(2,6-difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-acetamide (**46e**) (373 mg, 0.7 mmol), 7 mL of ethyl acetate, DIEA (738 μ L, 4.2 mol), and $^{\circ}$ T3P 50 % in EtOAc (1245 μ L, 2.1 mmol). The mixture was heated with microwave at 150°C for 10 min, with absorption level set on high. Reaction mixture was then diluted with EtOAc, washed by water, by saturated NaHCO_3 aq, and by brine. Organic phase was then dried over Na_2SO_4 and evaporated. Residue was then purified by flash chromatography (pure CHCl_3 to $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99/1) to give an orange solid corresponding to the titled product (192 mg, 53 %).

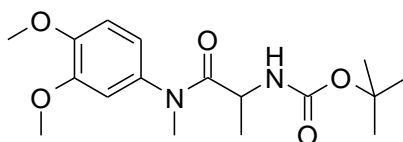
MS : $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 512.1

^1H -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 3.75-3.86 (m, 8H) ; 4.15 (s, 2H) ; 5.2-5.14 (m, 2H) ; 5.67 (Ddt, 1H, J = 17.4 Hz, J = 10.0 Hz, 5.5 Hz) ; 6.17 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.8 Hz) ; 6.30 (d, 1H, J = 2.8 Hz) ; 6.69 (d, 1H, J = 8.8 Hz) ; 6.74-6.86 (m, 2H) ; 6.88-6.98 (m, 4H) ; 7.04 (s, 1h) ; 7.18 (tt, 1H, J = 8.4 Hz, J = 6.5 Hz).

^{13}C -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 25.9 ; 55.3 ; 55.9 ; 56.4 ; 100.7 ; 106.6 ; 111.0-111.5 (m) ; 112.2 ; 113.6 (t, J = 19.3 Hz) ; 115.8 (d, J = 22.9 Hz) ; 117.3 ; 125.5 ; 129.2 (t, J = 10.8 Hz) ; 129.4 (d, J = 8.9 Hz) ; 130.8 (d, J = 3.2 Hz) ; 133.6 ; 138.4 ; 142.4 ; 142.7 ; 149.5 ; 161.2 (dd, J = 250.0 Hz, J = 7.6 Hz) ; 162.3 (d, J = 249.2 Hz).



Composé 47

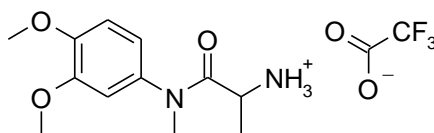


Step 2': tert-butyl N-[2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-methyl-2-oxo-ethyl]carbamate (**47a**)

In a 10 mL flask were added (3,4-Dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**8a**) (275 mg, 1.55 mmol), 3 mL Ethyl acetate, Boc-Ala-OH (351 mg, 1.86 mmol), $^{\circ}$ T3P (1366 μ L, 2.319 mmol),

and DIEA (810 μL , 4.64 mmol). Reaction mixture was then stirred at room temperature for 1 hour. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate, washed by water, saturated NaHCO_3 aq and brine, and the organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated to give the titled product as a yellow powder (523 mg, 66 %).

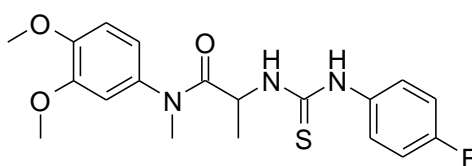
MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 339.2$



Step 3': [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-methyl-2-oxo-ethyl]ammonium;2,2,2-trifluoroacetate (**47b**)

tert-butyl N-[2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-methyl-2-oxo-ethyl]carbamate (**47a**) (345 mg, 1.0 mmol) was dissolved in 2.3 mL of dichloromethane. 1 mL of TFA was then gently added and reaction mixture was then stirred at room temperature for 30 min. Reaction mixture was then evaporated to dryness, to give a purple oil, corresponding to the expected product. This oil would enter the next step without further purification. Yield was considered to be 100%.

MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 239.1$

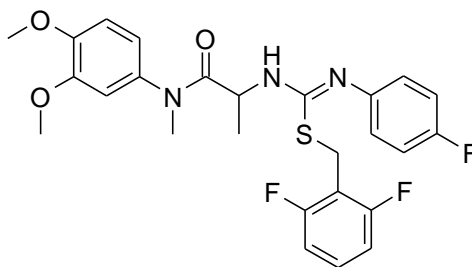


Step 4: N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-propionamide (**47c**)

4-fluorophenylisothiocyanate (150 mg, 0.982 mmol) and TEA (159 μL , 1.18 mmol) were added in a 50 mL flask in 3 mL Ethanol. [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-methyl-2-oxo-ethyl]ammonium ; 2,2,2-trifluoroacetate (**47b**) (0.982 mmol) was dissolved in 10 mL of ethanol, TEA was added until pH was over 8 and the mixture was added dropwise at r.t. After the addition, the reaction was over. Reaction mixture was evaporated to dryness, and purified by flash chromatography (pure cyclohexane to cHex/EtOAc 7/3), to give 295 mg of a white powder, corresponding to the expected product (94% purity), leading to a 72 % yield.

MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 392.1$

^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$) : δ (ppm) 1.10 (d, 3H, $J = 6.87$ Hz) ; 3.15 (s, 3H) ; 3.75-3.80 (m, 6H) ; 4.99 (m, 1H) ; 6.96 (dd, 1H, $J = 8.46$ Hz, $J = 2.25$ Hz) ; 7.10 (d, 1H, $J = 8.52$ Hz) ; 7.06-7.19 (m, 3H) ; 7.41-7.51 (m, 2H) ; 7.83 (d, 1H, $J = 7.73$ Hz).

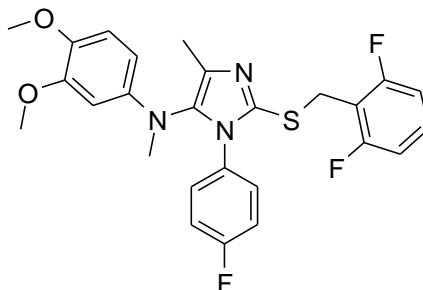


Step 5: 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-propionamide (**47d**)

In a 5mL flask were added N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-propionamide (**47c**) (75 mg, 180 μ mol), Potassium Carbonate (26 mg, 188 μ mol), sodium iodide (14 mg, 93 μ mol), and 1 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 10 min, and 2-(bromomethyl)-1,3-difluoro-benzene (40 mg, 193 μ mol) was then added. The suspension was stirred at room temperature for 16 hours. The medium was then evaporated, residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine, organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness. Residue was purified by flash chromatography (pure DCM to DCM/MeOH 97/3) to give the titled product as a white solid (78 mg, 84 %).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 518.2

^1H -NMR (CD_2Cl_2) : δ (ppm) 1.22 (d, 3H, J = 6.36 Hz) ; 3.25 (s, 3H) ; 3.63 (s, 3H) ; 3.85 (s, 3H) ; 4.11 (s, 2H) ; 4.58 (brs, 1H) ; 6.65-7.02 (m, 10H) ; 7.28 (m, 1H).



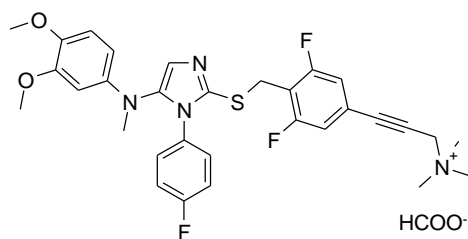
Step 6: [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-5-methyl-3H-imidazol-4-yl]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-propionamide (**47**)

2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-propionamide (**47d**) (78 mg, 0.15 mmol) was dissolved in 1.5 mL of dry ethyl acetate. DIEA (157.9 μ L, 0.90 mmol), and $^{\circ}\text{T3P}$ in EtOAc (266 μ L, 0.45 mmol) were then added. Half of the mixture was heated with microwave at 150°C for 10 min (Absorption set on high). The expected product was observed, starting material has disappeared, but unfortunately, reaction mixture was dirty. The other half of the reaction mixture was heated at reflux for 45 hours. $^{\circ}\text{T3P}$ (3eq.) and DIEA (6 eq.) were added after 4, 19, and 24 hours. $^{\circ}\text{T3P}$ (1.5eq.) and DIEA (3 eq.) were added after 42 hours. Reaction mixture was then diluted with EtOAc, washed by water, by saturated NaHCO_3 aq, and by brine. Organic phase was then dried over Na_2SO_4 and evaporated. Residue was then purified by preparative HPLC (pH 3.8) to give 4.5 mg of a yellowish solid (6 %).

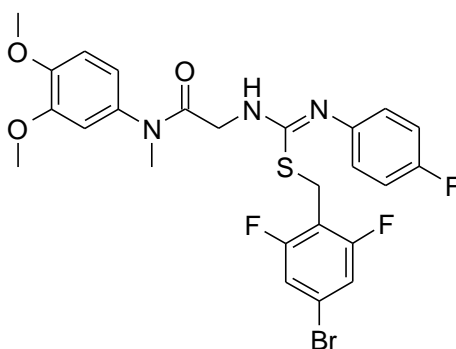
MS $[M+H]^+$ m/z = 500.1

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2.11 (s, 3H) ; 2.87 (s, 3H) ; 3.84 (s, 3H) ; 3.86 (s, 3H) ; 4.13 (s, 2H) ; 6.10 (dd, 1H, J = 8.72 Hz, J = 2.76 Hz) ; 6.23 (d, 1H, J = 2.75 Hz) ; 6.76-6.83 (m, 3H) ; 6.93-6.97 (m, 4H) ; 7.19 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 12.4 ; 26.3 ; 38.6 ; 55.9 ; 56.5 ; 98.1 ; 103.5 ; 111.1-111.3 (m) ; 112.7 ; 113.8 (t, J = 19.6 Hz) ; 115.9 (d, J = 22.9 Hz) ; 128.9 (d, J = 8.6 Hz) ; 129.1 (t, J = 10.0 Hz) ; 131.2 ; 133.6 ; 134.4 ; 136.6 ; 142.0 ; 142.9 ; 149.8 ; 161.2 (dd, J = 249.9 Hz, J = 7.7 Hz) ; 162.1 (d, J = 248.8 Hz).



Composé 48



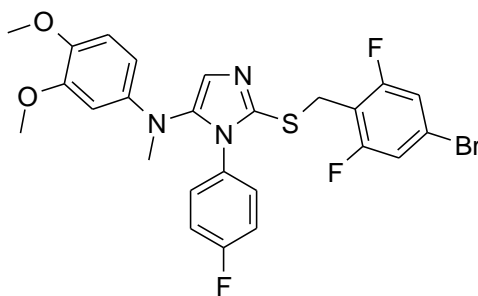
Step 5: 2-[2-(4-Bromo-2,6-difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**48a**)

(4-Bromo-2,6-difluoro-phenyl)-methanol (892 mg) and TEA (594 μL) were dissolved in dry DCM at 0°C . Mesylchloride (310 μL) was then added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature overnight. Water was then added to quench the reaction. Organic phase was washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 and evaporated to give an orange oil corresponding to 5-bromo-2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene ($^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 4.62 (s, 2H) ; 7.14 (d, 2H, J = 6.7 Hz)).

The titled product was then obtained as a yellowish powder (1.07 g, 95 %) following procedure C using N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**) (750 mg), and 5-bromo-2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (461 mg).

MS $[M+H]^+$ m/z = 583.8

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 3.15 (s, 3H) ; 3.73 (m, 8H) ; 4.14 (s, 2H) ; 6.60 (m, 2H) ; 6.79 (brs, 1H) ; 6.86 (m, 1H) ; 6.97 (m, 4H) ; 7.46 (m, 2H)

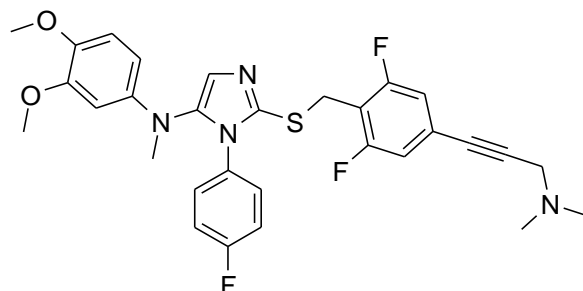


Step 6: [2-(4-Bromo-2,6-difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**48b**)

The titled product was obtained as an orange oil (867 mg, 74 %) following procedure D using 2-[2-(4-Bromo-2,6-difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**48a**) (1.07 g).

MS $[M+H]^+$ m/z = 565.9

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ (ppm) 2.91 (s, 3H) ; 3.64-3.65 (m, 6H) ; 3.97 (s, 2H) ; 6.04 (dd, 1H, J = 8.6 Hz, J = 2.6 Hz) ; 6.20 (d, 1H, J = 2.8 Hz) ; 6.76 (d, 1H, J = 8.7 Hz) ; 6.96 (s, 1H) ; 7.11 (dd, 2H, J = 9.0 Hz, J = 5.1 Hz) ; 7.19 (m, 2H) ; 7.41 (m, 2H).

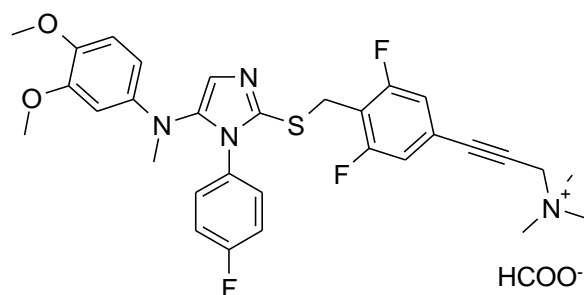


(3,4-Dimethoxy-phenyl)-[2-[4-(3-dimethylamino-prop-1-ynyl)-2,6-difluoro-benzylsulfanyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-methyl-amine (**48c**)

In a 25 mL flask, [2-(4-Bromo-2,6-difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**48b**) (600 mg), dimethylpropargylamine (172 μL), pyrrolidine (133 μL) were added in 5 mL of dry and degassed DMF. Then, $\text{PdCl}_2(\text{dppf})_2$ (68 mg) and CuI (20 mg) are added. Reaction mixture is heated under argon at 80°C for 6h. Reaction mixture is cooled down to room temperature, diluted with EtOAc, washed with brine, dried over Na_2SO_4 and evaporated. Crude product is purified by flash chromatography (DCM/hex then DCM/MeOH), to give 281 mg of a white powder (47 %).

MS $[M+H]^+$ m/z = 566.9

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2.35 (s, 6H) ; 2.91 (s, 3H) ; 3.45 (s, 2H) ; 3.79 (s, 3H) ; 3.82 (s, 3H) ; 4.08 (s, 2H) ; 6.15 (dd, 1H, J = 2.7 Hz, J = 8.7 Hz) ; 6.28 (d, 1H, J = 2.7 Hz) ; 6.72 (d, 1H, J = 8.7 Hz) ; 6.87 (d, 2H, J = 8.0 Hz) ; 6.97 (m, 4H) ; 7.02 (s, 1H)



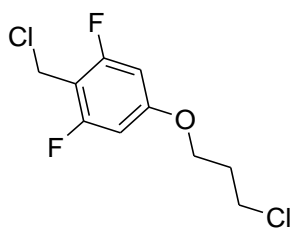
(3-{4-[5-[(3,4-Dimethoxy-phenyl)-methyl-amino]-1-(4-fluoro-phenyl)-1H-imidazol-2-ylsulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl}-prop-2-ynyl)-trimethyl-ammonium formate (**48**)

(3,4-Dimethoxy-phenyl)-[2-[4-(3-dimethylamino-prop-1-ynyl)-2,6-difluoro-benzylsulfanyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-methyl-amine (**48c**) (365 mg) was dissolved in 6.4 mL of a mixture of dry Et₂O/THF (1/1), under argon, and iodomethane (80 µL) was then added. Reaction mixture was stirred at room temperature. After 1h30 iodomethane (80 µL) was added again. After 30 min, reaction mixture was evaporated to dryness. Residue was then purified twice by preparative HPLC (HCOOH 0.1% first, then pH 9.2) to give the titled product as a yellowish powder (75 mg, 19%).

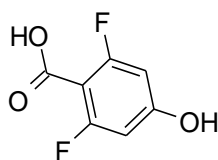
MS [M]⁺ *m/z* = 581.1

¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 2.94 (s, 3H) ; 3.45 (s, 9H) ; 3.78-3.80 (m, 6H) ; 4.01 (s, 2H) ; 4.87 (s, 2H) ; 6.16 (dd, *J* = 2.7 Hz, *J* = 8.7 Hz, 1H) ; 6.27 (d, *J* = 2.7 Hz) ; 6.71 (d, *J* = 8.7 Hz) ; 6.96-7.07 (m, 7H) ; 8.58 (s, 1H).

¹³C-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 25.9 ; 40.5 ; 53.4 ; 56.0 ; 56.6 ; 57.1 ; 89.6 ; 100.4 ; 106.0 ; 112.6 ; 115.5 (d, *J* = 26.8 Hz) ; 116.2 (d, *J* = 23.0 Hz) ; 116.8 (t, *J* = 19.2 Hz) ; 121.4 (t, *J* = 12.5 Hz) ; 124.3 ; 129.4 (d, *J* = 8.7 Hz) ; 131.0 (d, *J* = 3.2 Hz) ; 137.3 ; 140.4 ; 143.0 ; 143.2 ; 149.7 ; 160.9 (dd, *J* = 9.1 Hz, *J* = 251.9 Hz) ; 162.5 (d, *J* = 250.3 Hz) ; 167.5.



Intermédiaire i1



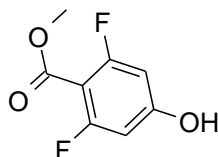
2,6-Difluoro-4-hydroxy-benzoic acid

2,6-Difluoro-4-hydroxy-benzonitrile (1.5 g) was dissolved in 7 mL distilled water and a solution of 1,35 g of NaOH in 4 mL water was then added. Reaction mixture was then heated at reflux for 4 days. Heating was then stopped, and reaction mixture was acidified by adding concentrated HCl, and extracted with Et₂O. Organic phase was then extracted by saturated NaHCO₃ aq. This aqueous solution was then acidified by adding concentrated HCl, and then

extracted by Et₂O. Organic phase was dried over Na₂SO₄, and evaporated, to give the titled product as a white solid (1.58 g, 94 %).

MS [M-H]⁻ *m/z* = 172.9

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) ; 6.49 (m, 2H) ; 10.96 (brs, 1H) ; 13.20 (brs, 1H)

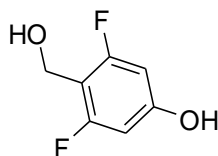


2,6-Difluoro-4-hydroxy-benzoic acid methyl ester

2,6-difluoro-4-hydroxy-benzoic acid (1.58g) was dissolved in 18 mL Methanol, concentrated sulphuric acid (257 μL) was then added and reaction mixture was heated at reflux overnight. Reaction mixture was then evaporated, and residue was dissolved in EtOAc, washed twice by water, brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated to give the titled product as a white powder (1.48 g, 90 %).

MS [M-H]⁻ *m/z* = 187.1

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) 3.80 (s, 3H) ; 6.54 (m, 2H) ; 11.12 (s, 1H)



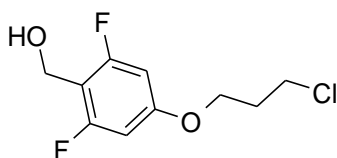
3,5-Difluoro-4-hydroxymethyl-phenol (**i1a**)

In a 100 mL flask were added 2,6-Difluoro-4-hydroxy-benzoic acid methyl ester (1.48 g), 26 mL anhydrous THF, and 34 mL of a 1M solution of diisobutylaluminum hydride (DIBAL-H) in cyclohexane at 0-5°C. Reaction mixture was then stirred at this temperature for 1.5h, and then poured into a 250 mL flask containing 27 mL of cold (0-5°C) 1M aqueous potassium sodium L-tartrate solution. Reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. Aqueous phase was extracted by EtOAc, and combined organic phases were then washed with brine, dried over Na₂SO₄, and evaporated. Aqueous phase was acidified to pH 5, and extracted by EtOAc. Organic phase was dried over Na₂SO₄ and evaporated. The titled product was obtained as a yellowish powders (1g, 80%).

MS [M-H]⁻ *m/z* = 159.0

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) 4.36 (d, 2H, *J* = 5.2 Hz) ; 5.00 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz) ; 6.41 (m, 2H) ; 10.28 (s, 1H)

Partie expérimentale

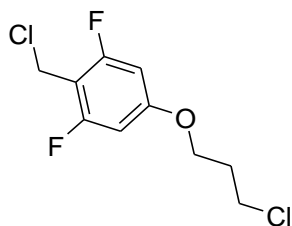


[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methanol

1-bromo-3-chloro-propane (1.30 mL, 13.2 mmol), 3,5-Difluoro-4-hydroxymethyl-phenol (**i1a**) (2.64 mmol, 423 mg) and potassium carbonate (365 mg, 2.64 mmol) were added in acetonitrile (9 mL) and the reaction mixture was stirred at reflux for 3 hours. The solvent was removed under reduced pressure. The crude was dissolved in EtOAc and washed with water. The aqueous phase was extracted by EtOAc, washed with brine and dried over Na₂SO₄. The solvents were removed under reduced pressure, to give the titled product as a colorless oil (602 mg, 96 %).

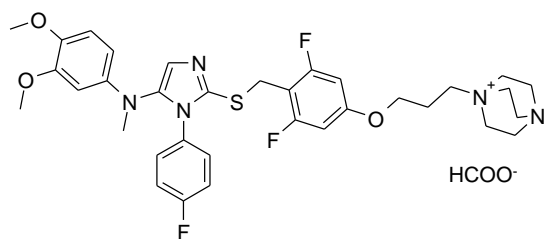
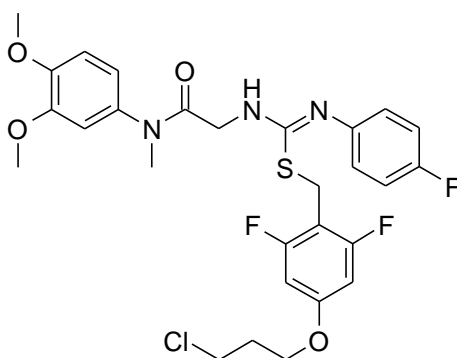
MS [M+H-H₂O]⁺ *m/z* = 218.9

¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 2.24 (quin, 2H, *J* = 6.05 Hz) ; 3.73 (t, 2H, *J* = 6.26 Hz) ; 4.10 (t, 2H, *J* = 5.82 Hz) ; 4.71 (s, 2H) ; 6.41-6.52 (m, 2H).



2-Chloromethyl-5-(3-chloro-propoxy)-1,3-difluoro-benzene (**i1**)

[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methanol (602 mg, 2.54 mmol) and TEA (428 μ L, 3.17 mmol) were dissolved in 5 mL dry DCM at 0°C. Mesylchloride (197 μ L, 2.54 mmol) was then added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature overnight. Reaction mixture was then evaporated to dryness. Water was added to quench the reaction. The organic phase was then washed with water and brine, and dried over Na₂SO₄, and then evaporated. The obtained residue corresponding to the titled product would enter the next step without further purification.

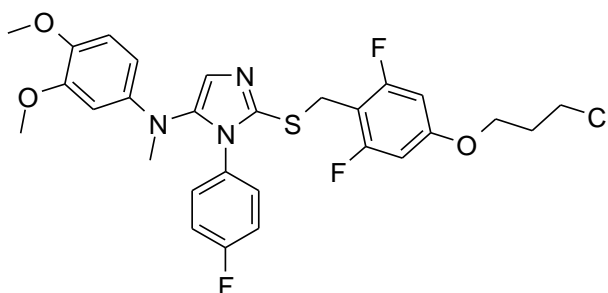
**Composé 49**

Step 5: 2-[2-[2,6-Difluoro-4-(3-chloropropoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**49a**)

The titled product was obtained as a yellowish solid (915 mg, 73 %), following Procedure C, using N-(3,4-Dimethoxy-benzyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-thioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**) (800 mg, 2.12 mmol) and 2-Chloromethyl-5-(3-chloro-propoxy)-1,3-difluoro-benzene (**i1**).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 595.9

^1H -NMR (CDCl_3) : δ (ppm) 2.15 (quin, 2H, J = 5.93 Hz) ; 3.27 (s, 3H) ; 3.66 (t, 2H, J = 6.19 Hz) ; 3.76-3.93 (m, 8H) ; 3.95-4.14 (m, 4H) ; 6.32-6.46 (m, 2H) ; 6.60-6.94 (m, 7H).



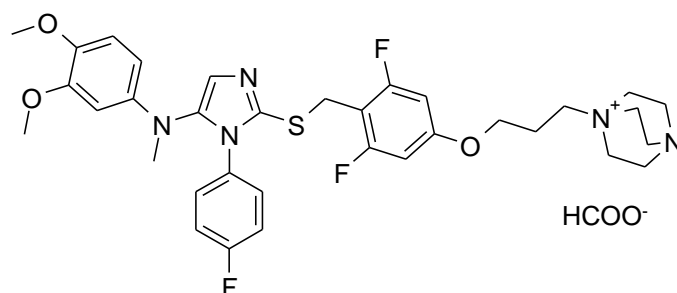
Step 6 : [2-(2,6-Difluoro-4-(3-chloropropoxy)-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**49b**)

The titled product was obtained as a brown solid (895 mg, 96%), following Procedure D (without Flash Chromatography purification), using 2-[2-[2,6-Difluoro-4-(3-chloropropoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**49a**) (915 mg, 1.56 mmol).

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 577.9

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2.21 (quin, 2H, $J = 6.01$ Hz) ; 2.91 (s, 3H) ; 3.72 (t, 2H, $J = 6.19$ Hz) ; 3.77-3.86 (m, 6H) ; 4.00-4.14 (m, 4H) ; 6.16 (dd, 1H, $J = 8.69$ Hz, $J = 2.78$ Hz) ; 6.30 (d, 1H, $J = 2.73$ Hz) ; 6.32-6.42 (m, 2H) ; 6.72 (d, 1H, $J = 8.73$ Hz) ; 6.91-7.05 (m, 5H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 25.8 ; 31.8 ; 40.1 ; 41.1 ; 55.9 ; 56.4 ; 64.8 ; 98.0-98.6 (m) ; 100.0 ; 105.5 ; 105.6 (t, $J = 20.2$ Hz) ; 112.4 ; 115.9 (d, $J = 22.9$ Hz) ; 124.3 ; 129.2 (d, $J = 8.7$ Hz) ; 130.9 (d, $J = 3.1$ Hz) ; 138.5 ; 139.5 ; 142.7 ; 143.2 ; 149.6 ; 159.5 (t, $J = 14.1$ Hz) ; 161.7 (dd, $J = 248.1$ Hz, $J = 11.0$ Hz) ; 162.3 (d, $J = 249.2$ Hz).



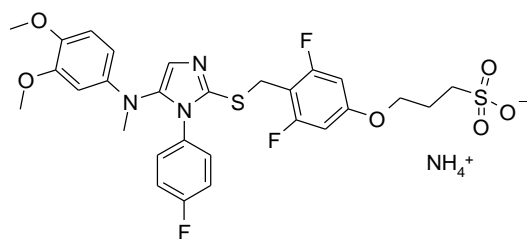
2-[[4-[3-(1-aza-4-azoniabicyclo[2.2.2]octan-4-yl)propoxy]-2,6-difluorophenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine ; formate (**49**)

[2-(2,6-Difluoro-4-(3-chloropropoxy)-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**49b**) (225 mg, 370 μmol) and 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) (112 mg, 1.0 mmol) were dissolved in dry acetonitrile (3.7 mL). Reaction mixture was then heated under microwave irradiation at 100 °C for 30 min. It was then evaporated to dryness and purified by preparative HPLC (ammonium formate buffer, pH = 9.2) to give the titled compound as a pale orange powder (60 mg, 23%).

MS $[M]^+$ $m/z = 654.2$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 2.31 (brs, 2H) ; 2.94 (s, 3H) ; 3.32 (brs, 6H) ; 3.48-3.82 (m, 14H) ; 3.94 (s, 2H) ; 4.06 (brs, 2H) ; 6.16 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.7$ Hz, 1H) ; 6.27 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H) ; 6.35-6.47 (m, 2H) ; 6.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H) ; 6.93-7.11 (m, 5H) ; 8.60 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ (ppm) 22.1 ; 25.7 ; 40.3 ; 45.3 ; 52.6 ; 55.9 ; 56.5 ; 61.8 ; 65.2 ; 98.2-98.8 (m) ; 100.1 ; 105.9 ; 106.0 (t, $J = 20.1$ Hz) ; 112.5 ; 116.0 (d, $J = 22.9$ Hz) ; 123.9 ; 129.3 (d, $J = 8.8$ Hz) ; 130.9 (d, $J = 3.2$ Hz) ; 137.8 ; 140.1 ; 142.8 ; 143.1 ; 149.6 ; 159.0 (t, $J = 14.1$ Hz) ; 161.6 (dd, $J = 248.2$ Hz, $J = 11.0$ Hz) ; 162.3 (d, $J = 249.3$ Hz).

**Composé 50**

ammonium; 3-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenoxy]propane-1-sulfonate (**50**)

In a 2-5mL microwave tube, [2-(2,6-Difluoro-4-(3-chloropropoxy)-benzylsulfanyl)-3-(4-fluorophenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**49b**) (540 mg, 0.89 mmol) was dissolved in 6 mL of a mixture of dioxane and water (1/1, V/V). Sodium sulfite (559 mg, 4.44 mmol) and sodium iodide (133 mg, 0.89 mmol) were then added. Reaction mixture was the successively heated under microwave irradiation according to the following settings :

[MWx : temperature, time, sensitivity]

MW1 : 130°C, 30 min, Very high.

MW2 : 130 °C, 40 min, Very high.

Then Sodium sulfite (223 mg, 1.8 mmol) and sodium iodide (53 mg, 0.36 mmol) were added again, before MW3.

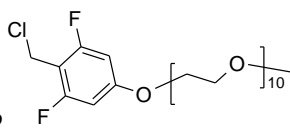
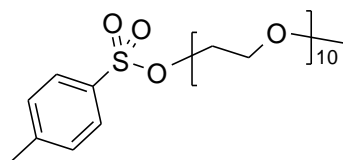
MW3 : 130 °C, 30 min, Very high.

Reaction mixture was evaporated to dryness and purified by preparative HPLC (ammonium formate buffer pH = 3.8) to give the titled product a yellowish powder (207 mg, 36 %).

MS [M]⁻ m/z = 622.1

¹H-NMR (MeOD-*d*₄) : δ (ppm) 2.18-2.30 (m, 2H) ; 2.92-3.02 (m, 5H) ; 3.73 (s, 3H) ; 3.75 (s, 3H) ; 3.93 (s, 2H) ; 4.11 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz) ; 6.16 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.8 Hz) ; 6.30 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz) ; 6.48-6.58 (m, 2H) ; 6.78 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz) ; 6.89-6.98 (m, 2H) ; 6.99-7.11 (m, 3H).

¹³C-NMR (MeOD-*d*₄) : δ (ppm) 24.6 ; 26.6 ; 39.8 ; 47.7 ; 55.2 ; 55.8 ; 67.2 ; 98.0-98.3 (m) ; 101.7 ; 105.3 (t, *J* = 20.0 Hz) ; 107.6 ; 113.1 ; 115.3 ; (d, *J* = 23.4 Hz) ; 121.4 ; 129.7 (d, *J* = 9.0 Hz) ; 130.6 (d, *J* = 3.1 Hz) ; 137.3 ; 141.1 ; 142.9 ; 143.5 ; 149.8 ; 160.2 (t, *J* = 14.3 Hz) ; 161.5 (dd, *J* = 246.6 Hz, *J* = 11.2 Hz) ; 162.6 (d, *J* = 248.3 Hz).

**Intermédiaire i2**

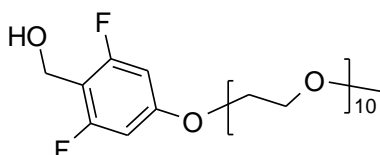
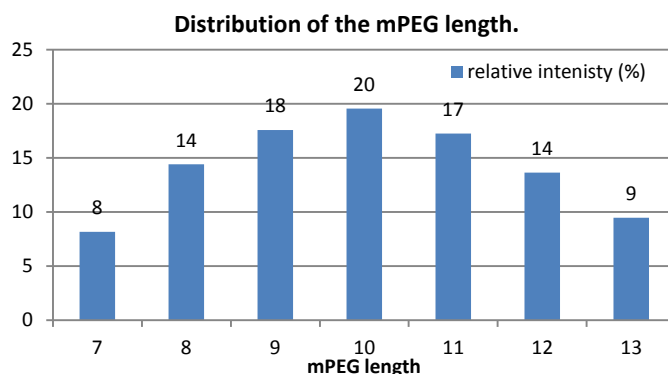
4-methylbenzenesulfonic acid methoxy-polyethyleneglycol ester (average MW = 627 g/mol)
(**mPEG-Ts**)

Polyethyleneglycol methyl ether (1.5 g) (mean MW = 500 g/mol) was dissolved in dry THF (10 mL). The solution was cooled at 0°C. NaH 60% (w/w) (180 mg) was added and the

reaction mixture was stirred from 0°C to 20 °C for 2 h. Then tosyl chloride (1.14 g) was added at 0°C and reaction mixture was stirred at r.t. for 24 hours. Reaction mixture was then evaporated, and residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH) to give the titled product as a colorless oil (1.68 g, 89 %).

MS $[M + H_3O]^+$ $m/z = 644.3$ ($n = 10$)

1H -NMR (DMSO- d_6) : δ (ppm) 2.41 (s, 3H) ; 3.23 (s, 3H) ; 3.44-3.49 (m, 36 H) ; 3.57 (m, 2H) ; 4.10 (m, 2H) ; 7.48 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz) ; 7.78 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz).

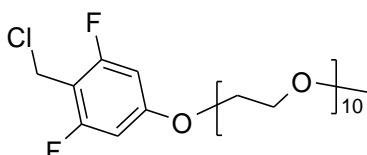


[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-phenyl]-methanol (average MW = 615 g/mol)
(**i2a**)

4-methylbenzenesulfonic acid methoxy-polyethyleneglycyl ester (average MW = 627 g/mol) (**mPEG-Ts**) (1.5 mmol, 981 mg) was dissolved in MeCN (5 mL), 3,5-Difluoro-4-hydroxymethyl-phenol (**i1a**) (1.80 mmol, 288 mg) and K_2CO_3 (1.80 mmol, 249 mg) were added, and reaction mixture was stirred overnight under reflux. Reaction mixture was then cooled down, and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum and purified by Flash Chromatography (DCM/MeOH) to give the titled product as a colorless oil (676 mg, 73%).

MS $[M + H_3O]^+$ $m/z = 632.2$ ($n = 10$)

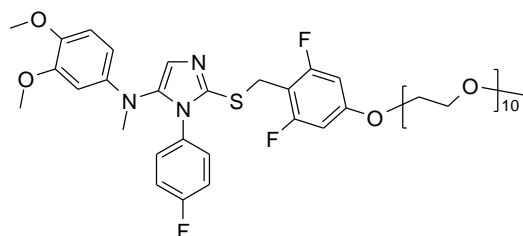
1H -NMR (DMSO- d_6) : δ (ppm) 3.23 (s, 3H) ; 3.41-3.56 (m, 42H) ; 3.72 (m, 2H) ; 4.11 (m, 2H) ; 4.40 (d, 2H, $J = 5.5$ Hz) ; 5.08 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz) ; 6.71 (m, 2H).



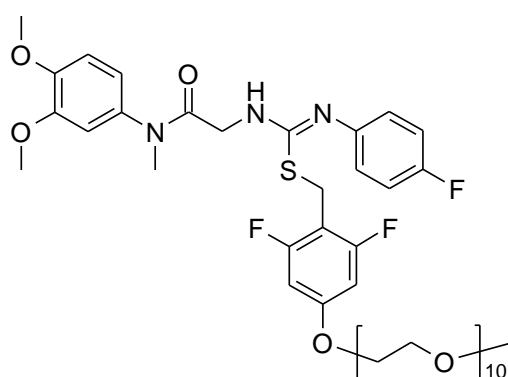
2-Chloromethyl-1,3-difluoro-5-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzene (**i2**)

[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-phenyl]-methanol (average MW = 615 g/mol) (**i2a**) and TEA (156 μ L) were dissolved in dry DCM at 0°C. Mesylchloride (82 μ L) was then

added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature overnight. TEA (47 μ L) and mesylchloride (25 μ L) were then added. After 1 hour, TEA (156 μ L) and mesylchloride (82 μ L) were added again. After 3 hours, TEA (47 μ L) was added again. Reaction mixture was then evaporated to dryness. The residue, corresponding to the titled product, would enter the next step without further purification.



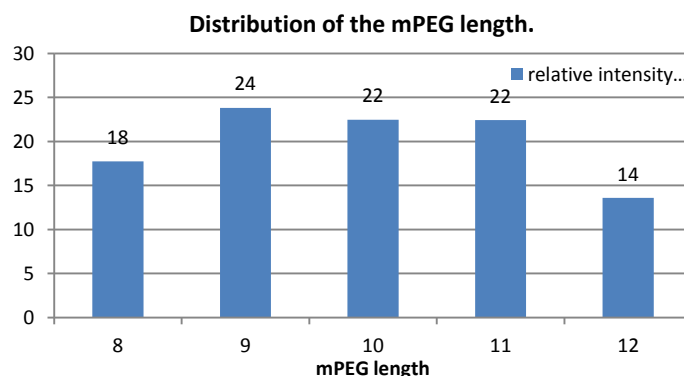
Composé 51



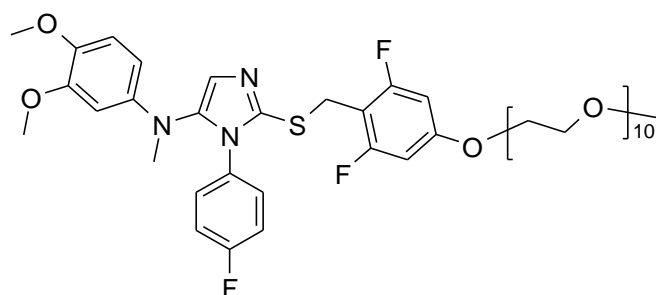
Step 5: 2-[2-[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (average MW = 1012.7 g/mol) **(51a)**

This residue corresponding to 2-Chloromethyl-1,3-difluoro-5-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzene (**i2**) was added to a 25 mL flask loaded with N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**) (397 mg), K₂CO₃ (45 mg), NaI (79 mg), and 4 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 14 hours. Reaction mixture was then evaporated and purified by flash chromatography (cHex/DCM then DCM MeOH) to give 499 mg of a brown oil (47 %).

MS [M+H+ H₃O]²⁺ m/z = 518.4 ($n = 10$)



Partie expérimentale



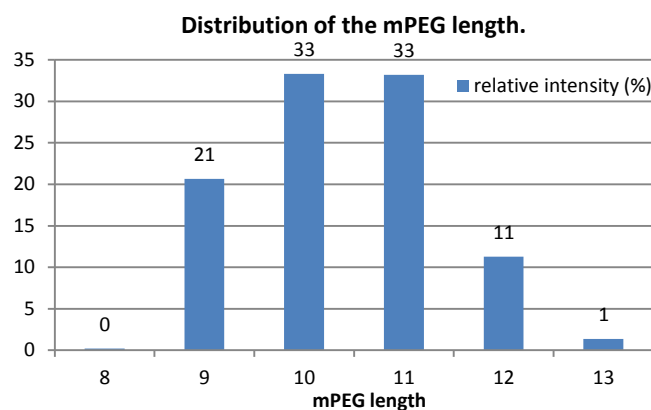
Step 6: [2-[2,6-Difluoro-4-(2-methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzylsulfanyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (average MW = 972.1 g/mol) (**51**)

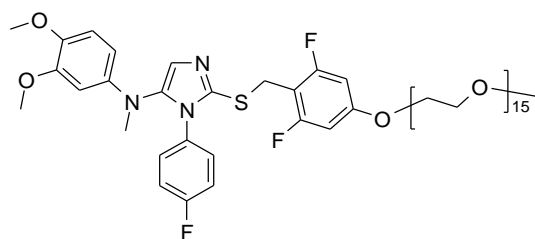
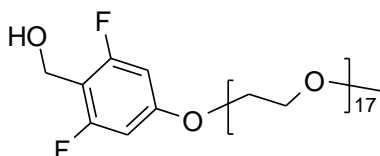
The titled compound was obtained as an orange oil (75 mg, 16 %) following Procedure D, using 2-[2-[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (average MW = 1012.7 g/mol) (**51a**) (499 mg). Purification was performed by preparative HPLC.

MS [M+H+ H₃O]²⁺ m/z = 487.2 ($n = 10$)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) 2.92 (s, 3H) ; 3.23 (s, 3H) ; 3.42-3.55 (m, 42H) ; 3.63-3.64 (m, 6H) ; 3.70-3.73 (m, 2H) ; 3.99 (s, 2H) ; 4.09-4.12 (m, 2H) ; 6.06 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 8.6$ Hz, 1H) ; 6.21 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H) ; 6.67-6.70 (m, 2H) ; 6.75 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H) ; 6.96 (s, 1H) ; 7.09-7.22 (m, 4H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) 26.1 ; 55.9 ; 56.5 ; 58.5 ; 68.6 ; 69.0 ; 70.0 ; 70.2 ; 70.3 ; 71.7 ; 99.1 (d, $J = 28.0$ Hz) ; 99.9 ; 105.4 (t) ; 105.5 ; 113.7 ; 116.3 (d, $J = 22.9$ Hz) ; 124.3 ; 130.0 (d, $J = 9.0$ Hz) ; 131.5 (d, $J = 3.6$ Hz) ; 137.3 ; 140.1 ; 142.5 ; 143.4 ; 149.7 ; 161.3 (dd) ; 162.1 (d)



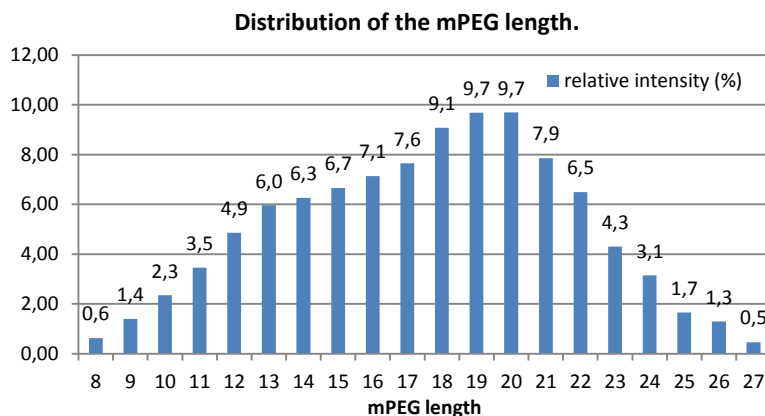
**Composé 52**

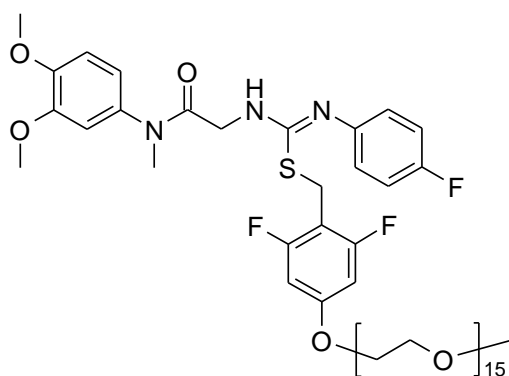
[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-phenyl]-methanol (average MW = 947 g/mol).

Polyethyleneglycol methyl ether tosylate (average molecular weight = 900 g/mol) (1.2 mmol, 1080 mg) was dissolved in acetonitrile (4 mL), 3,5-Difluoro-4-hydroxymethyl-phenol (1.32 mmol, 211 mg) and K_2CO_3 (1.44 mmol, 199 mg) were added. The reaction mixture was stirred overnight under reflux. The reaction mixture was then cooled down, and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum and purified by preparative HPLC, to give a white viscous residue corresponding to the titled product (697 mg, 61%).

MS $[M + H_3O]^+ m/z = 808.2$ ($n = 14$)

1H -NMR ($DMSO-d_6$) : δ (ppm) 3.23 (s, 3H) ; 3.38-3.58 (m, 66H) ; 3.72 (m, 2H) ; 4.11 (m, 2H) ; 4.40 (s, 2H) ; 6.71 (m, 2H).

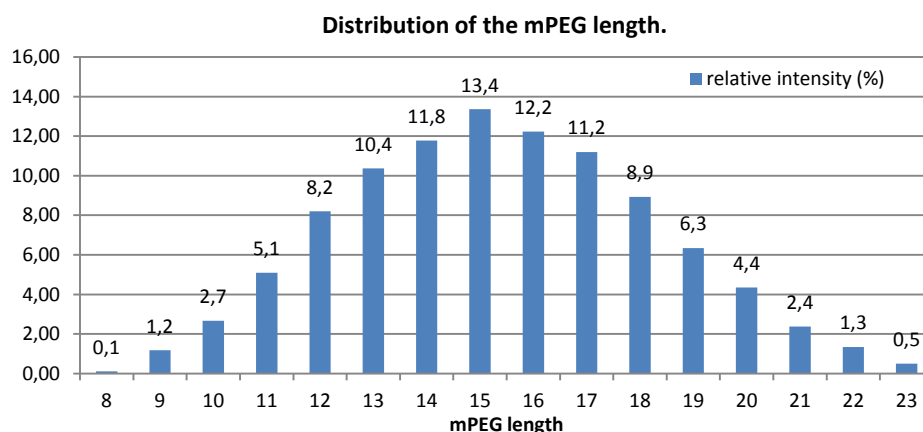


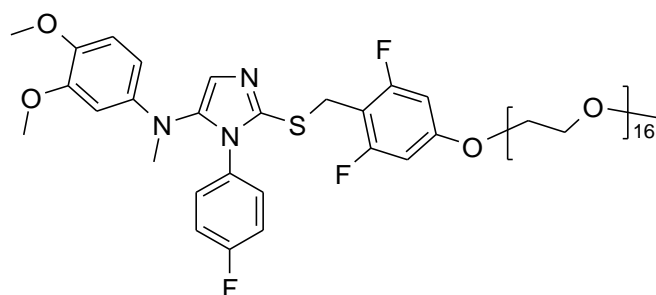


Step 5 : 2-[2-[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (average MW = 1209 g/mol)
(52a)

[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-phenyl]-methanol (average MW = 947 g/mol) (697 mg, 0.74 mmol) and TEA (144 μ L, 1.07 mmol) were dissolved in 2 mL dry DCM at 0°C. Mesylchloride (68.6 μ L, 0.89 mmol) was then added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature overnight. Reaction mixture was then evaporated to dryness. This residue was added to a 25 mL flask loaded with N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**) (279 mg, 0.74 mmol), K_2CO_3 (153 mg, 1.11 mmol), and 4 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 4 hours. Then K_2CO_3 (102 mg, 0.74 mmol) was added, and reaction was stirred at 50°C for 16 hours. Reaction mixture was then evaporated to dryness and purified twice by flash chromatography (pure DCM to DCM/MeOH 98/2) to give the titled product as a pale pink solid (146 mg, 17%).

MS $[M+H+H_3O]^{2+}$ m/z = 606.2 ($n = 15$)





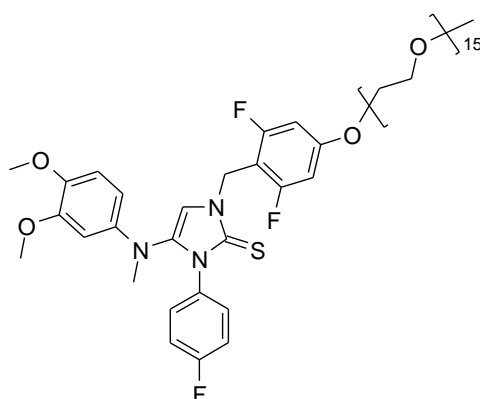
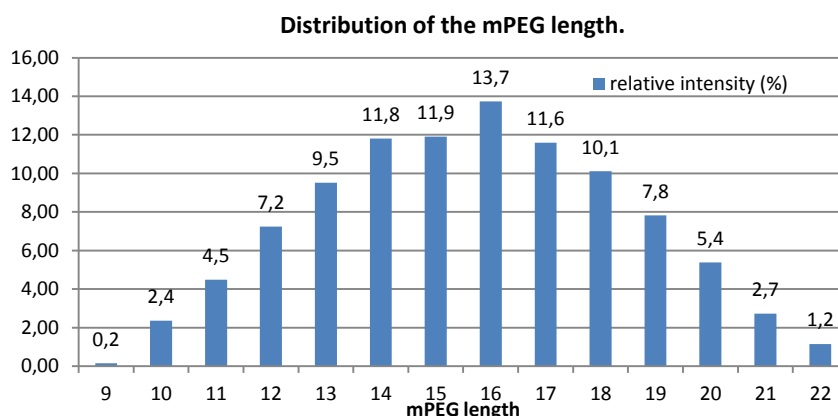
Step 6: [2-[2,6-Difluoro-4-(2-methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzylsulfanyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (average MW = 1204 g/mol) (**52**)

The titled compound was obtained as an orange oil (20mg, 13 %) following Procedure D, using 2-[2-[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (average MW = 1209 g/mol) (**52a**) (148 mg). Purification was performed by preparative HPLC.

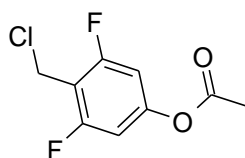
MS [M+H+H₃O]²⁺ m/z = 619.2 ($n = 16$)

¹H-NMR (CD₂Cl₂) : δ (ppm) 2.96 (s, 3H) ; 3.36 (s, 3H) ; 3.50-3.72 (m, 80H) ; 3.74-3.77 (m, 6H) ; 3.78-3.88 (m, 4H) ; 4.04-4.14 (m, 4H) ; 6.15 (dd, 1H, $J = 8.70$ Hz, $J = 2.79$ Hz) ; 6.27 (d, 1H, $J = 2.79$ Hz) ; 6.41-6.50 (m, 2H) ; 6.72 (d, 1H, $J = 8.70$ Hz) ; 6.96-7.07 (m, 5H).

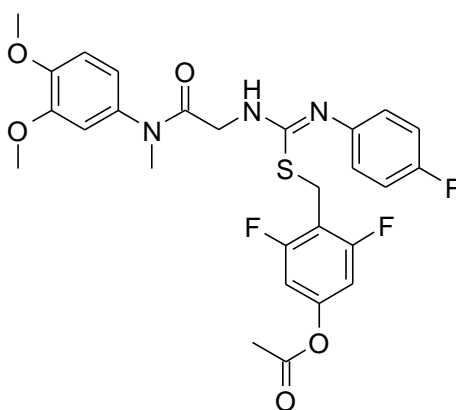
¹³C-NMR (CD₂Cl₂) : δ (ppm) 25.8 ; 40.1 ; 55.8 ; 56.4 ; 58.6 ; 68.3 ; 69.2 ; 70.3 ; 70.4 ; 70.5 ; 70.8 ; 71.9 ; 98.1-98.7 (m) ; 100.1 ; 105.5 ; 105.6 (t, $J = 20.5$ Hz) ; 112.9 ; 115.7 (d, $J = 23.0$ Hz) ; 124.0 ; 129.3 (d, $J = 8.8$ Hz) ; 131.1 (d, $J = 3.3$ Hz) ; 138.0 ; 139.8 ; 142.8 ; 143.3 ; 149.8 ; 159.7 (t, $J = 14.5$ Hz) ; 161.6 (dd, $J = 247.1$ Hz, $J = 11.3$ Hz) ; 162.3 (d, $J = 248.3$ Hz).



Composé 52'

Acetic acid 4-chloromethyl-3,5-difluoro-phenyl ester (**i4**)

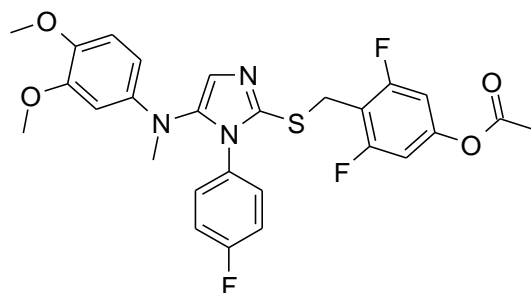
In a 10 mL flask 3,5-Difluoro-4-hydroxymethyl-phenol (752 mg, 4.70 mmol) was added portion wise in acetyl chloride (1.74 mL, 24.4 mmol) at 0°C. Reaction mixture was then stirred at room temperature overnight, without capping the flask. Reaction mixture was then evaporated to dryness. An oily residue was obtained, that could correspond in NMR to the titled product. It would be used without further purification in the next step.

Acetic acid 4-[N-{(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-carbamoyl}-methyl]-N'-(4-fluoro-phenyl)-carbamimidoylsulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl ester (**i3a**)

In a 100 mL flask were added 983 mg of N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**), 360 mg of Potassium Carbonate, 195 mg of sodium Iodide, and 13 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 10 min, and 727 mg of Acetic acid 4-chloromethyl-3,5-difluoro-phenyl ester (**i4**) were then added. The suspension was stirred at room temperature for 14 hours. The medium was then evaporated, residue as dissolved in AcOEt, washed with water and brine, organic phase was dried over Na₂SO₄ and evaporated. After purification by flash chromatography (pure cHex to cHex/EtOAc 6/4), the titled product was obtained as a yellowish oil (513 mg, 32%)

MS [M+H]⁺ *m/z* = 561.9

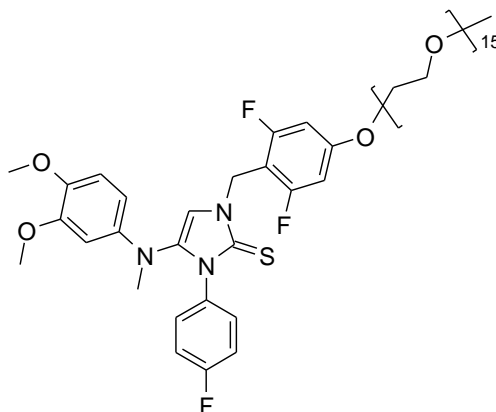
¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 2.25 (s, 3H) ; 3.27 (s, 3H) ; 3.80-3.89 (m, 8H) ; 4.06 (s, 2H) ; 6.62-6.98 (m, 10H).



Acetic acid 4-[5-[(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amino]-1-(4-fluoro-phenyl)-1H-imidazol-2-ylsulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl ester (**i3b**)

In a 50 mL flask were introduced Acetic acid 4-[N-[(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-carbamoyl]-methyl]-N'-(4-fluoro-phenyl)-carbamiimidoylsulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl ester (**i3a**) (513 mg, 860 μmol), 9 mL of ethyl acetate, diisopropylethylamine (900 μL , 5.15 mmol), and $^{\text{®}}$ T3P (1518 μL , 2.58 mmol). The mixture was heated at reflux for 24h. After 4 and 7 hours, diisopropylethylamine (900 μL , 5.15 mmol), and $^{\text{®}}$ T3P (1518 μL , 2.58 mmol) were added again. After 22 and 28 hours, diisopropylethylamine (450 μL , 2.58 mmol), and $^{\text{®}}$ T3P (759 μL , 1.29 mmol) were added again. Then, reaction was over and the reaction mixture was diluted in AcOEt. The solution was then washed with saturated $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ and brine. Organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The titled product was obtained as a brown solid (455mg, 97% yield) and was considered pure enough to enter the next step without further purification.

MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 544.0$



1-[2,6-Difluoro-4-(2-methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzyl]-4-[(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amino]-3-(4-fluoro-phenyl)-1,3-dihydro-imidazole-2-thione (average MW = 1179 g/mol) (**52'**)

Residue corresponding to Acetic acid 4-[5-[(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amino]-1-(4-fluoro-phenyl)-1H-imidazol-2-ylsulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl ester (**i3b**) (355 mg, 0.65 mmol) was dissolved in 2.6 mL ethanol. The mixture was cooled down to 0 - 5°C, and 1.3 mL of NaOH 0.5M were added. Reaction mixture was stirred at 0 - 5°C for 6 hours. At that time, all the starting material had been consumed. Reaction mixture was then neutralized by addition of HCl 1N to pH = 5-6. A precipitate was then observed. The suspension was diluted

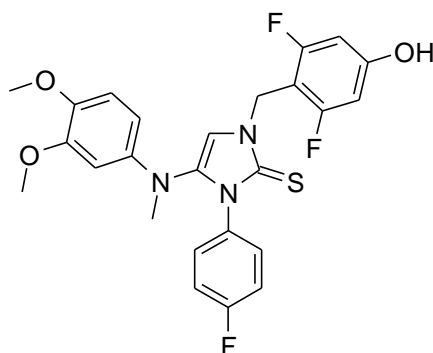
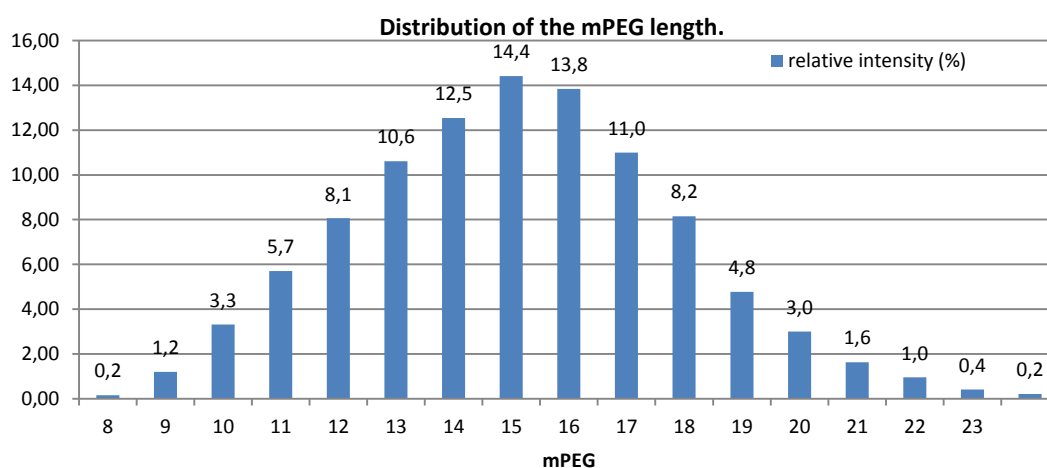
by addition of distilled water, and filtrated to give a pale brown powder. Purification by flash chromatography was performed twice (DCM to DCM/MeOH 98/2, then cHex/DCM 1/1 to DCM/MeOH 98.5/1.5) to give a brown solid that was thought to be 4-[5-[(3,4-Dimethoxy-phenyl)-methyl-amino]-1-(4-fluoro-phenyl)-1H-imidazol-2-ylsulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenol (**i3**) (92 mg, 28%).

Polyethyleneglycol methyl ether tosylate (average molecular weight = 900 g/mol) (0.15 mmol, 135 mg) was dissolved in acetonitrile (0.5mL), and the brown solid obtained previously (0.18 mmol, 92 mg) and K₂CO₃ (0.18 mmol, 25 mg) were added. The reaction mixture was stirred under reflux for 4 hours. The reaction mixture was then cooled down and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum and purified by preparative HPLC to give the titled product as a reddish oil (95 mg, 45%).

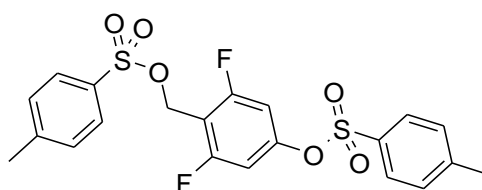
MS [M+H+H₃O]²⁺ *m/z* = 597.2 (*n* = 15)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) 2,90 (s, 3H) ; 3.24 (s, 3H) ; 3.38-3.66 (m, 64H) ; 3.70-3.78 (m, 2H) ; 4.10-4.19 (m, 2H) ; 5.23 (s, 2H) ; 6.10 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.8 Hz) ; 6.22 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz) ; 6.73 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz) ; 6.78-6.88 (m, 2H) ; 7.04 (s, 1H) ; 7.15-7.34 (m, 4H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) : δ (ppm) 40.1 ; 40.3 ; 55.7 ; 56.5 ; 58.5 ; 68.6-69.1 (m) ; 70.0-70.5 (m) ; 71.7 ; 99.1-99.6 (m) ; 100.4 ; 103.7 (t, *J* = 19.8 Hz) ; 105.7 ; 112.8 ; 113.6 ; 116.0 (d, *J* = 22.9 Hz) ; 131.0 (d, *J* = 9.1 Hz) ; 132.4 (d, *J* = 2.8 Hz) ; 134.6 ; 142.6 ; 142.9 ; 149.7 ; 160.7 (t, *J* = 14.9 Hz) ; 161.9 (d, *J* = 245.4) ; 162.1 (dd, *J* = 246.7 Hz, *J* = 11.4 Hz) ; 162.4.



Intermédiaire i3'

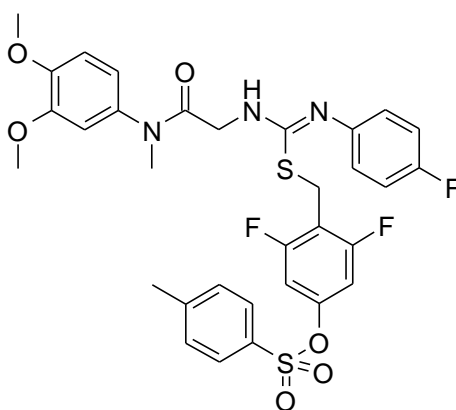


[2,6-difluoro-4-(p-tolylsulfonyloxy)phenyl]methyl 4-methylbenzenesulfonate (**i4**)

In a 10 mL flask under argon was added 3,5-difluoro-4-(hydroxymethyl)phenol (160 mg, 1.0 mmol), and NaH (120 mg, 3.0 mmol) in 3 mL dry THF at 0-5°C. Reaction mixture was let warm up to room temperature for 30 min. Then, tosyl chloride (457 mg, 2.4 mmol) was added at 0-5 °C, and reaction was let warm up to room temperature and stirred for 5 hours. Reaction mixture was then evaporated. Residue was diluted with EtOAc, washed with water, saturated NaHCO_{3aq} and brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. Residue was purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 85/15) to give the titled product as a yellowish solid (317 mg, 68%).

MS [M-TsO[•]]⁺ *m/z* = 296.9

¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 2.47 (s, 3H) ; 2.49 (s, 3H) ; 5.07 (s, 2H) ; 6.56-6.65 (m, 2H) ; 7.31-7.41 (m, 4H) ; 7.69-7.77 (m, 2H) ; 7.77-7.84 (m, 2H).

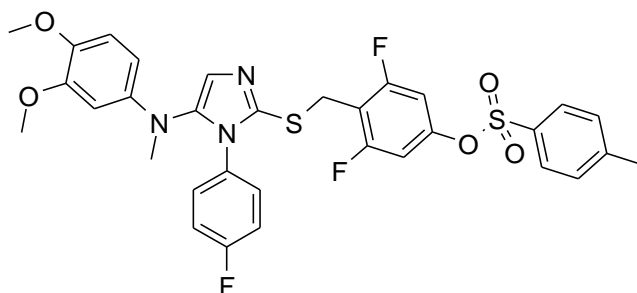


Step 5: Toluene-4-sulfonic acid 4-[N-[(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-carbamoyl]-methyl]-N'-(4-fluoro-phenyl)-carbamidoylsulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl ester (**i3c**)

The titled product was obtained as a yellowish solid (342 mg, 78 %), following Procedure C, using N-(3,4-Dimethoxy-benzyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-thioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**) (247 mg, 0.65 mmol) and [2,6-difluoro-4-(p-tolylsulfonyloxy)phenyl]methyl 4-methylbenzenesulfonate (**i4**) (306 mg, 0.65 mmol).

MS [M+H]⁺ *m/z* = 673.9

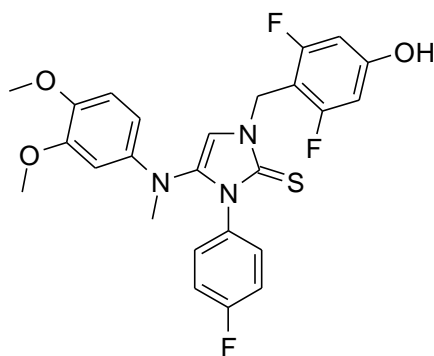
¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) 2.47 (s, 3H) ; 3.30 (s, 3H) ; 3.80-3.96 (m, 8H) ; 4.09 (brs, 2H) ; 6.54-7.04 (m, 9H) ; 7.38 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz) ; 7.73 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz).



Step 6: Toluene-4-sulfonic acid 4-[5-[(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amino]-1-(4-fluoro-phenyl)-1H-imidazol-2-ylsulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl ester (**i3d**)

The titled compound was obtained as an orange oil (307 mg, 84 %) following Procedure D, using Toluene-4-sulfonic acid 4-[N-[[[(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-carbamoyl]-methyl]-N'-(4-fluoro-phenyl)-carbamiimidoylsulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl ester (**i3c**) (330 mg).

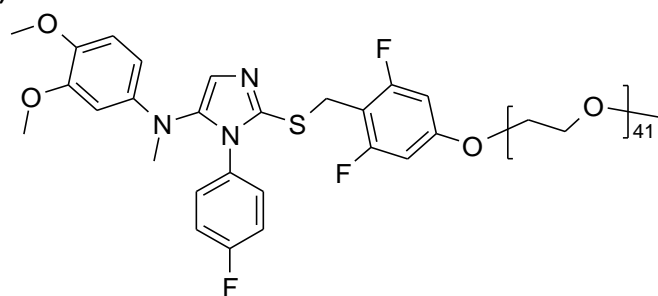
MS [M+H]⁺ *m/z* = 656.0



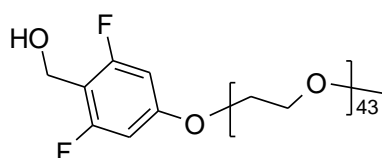
1-(2,6-Difluoro-4-hydroxy-benzyl)-4-[(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amino]-3-(4-fluoro-phenyl)-1,3-dihydro-imidazole-2-thione (**i3'**)

Toluene-4-sulfonic acid 4-[5-[(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amino]-1-(4-fluoro-phenyl)-1H-imidazol-2-ylsulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl ester (**i3d**) (15 mg, 20 μmol) and TBAF (6.4 mg, 20 μmol) were dissolved in 1mL DMF. Reaction mixture was stirred at room temperature for 20 hours. TBAF (6.4 mg, 20 μmol) was added again, and reaction mixture was then heated at reflux for 22 hours. Reaction mixture was then evaporated to dryness, residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine, organic phase was dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The residue was analyzed by NMR, and happened to differ from the expected 5-amino-2-thioimidazole derivative **i3**, so no further purification was performed.

MS [M+H]⁺ *m/z* = 501.9



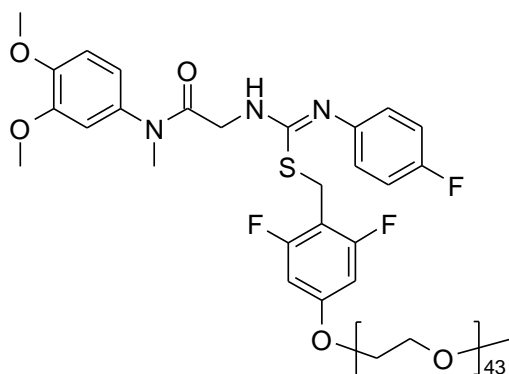
Composé 53



[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-phenyl]-methanol (**53a**)

Polyethyleneglycol methyl ether tosylate (average molecular weight = 2000 g/mol) (1.2 mmol, 2400 mg) was dissolved in acetonitrile (4 mL), 3,5-Difluoro-4-hydroxymethyl-phenol (1.32 mmol, 211 mg) and K_2CO_3 (1.44 mmol, 199 mg) were added. The reaction mixture was stirred overnight under reflux. The reaction mixture was then cooled down, and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum. Then residue was partially solubilized in a DCM/MeOH 99/1 mixture, and Et_2O was then added, leading to the formation of a precipitate (mainly corresponding to the tosylate), which was filtered. Filtrate was evaporated to dryness to give the titled product as a white solid. It was used without further purification in the next step, yield was considered to be 100%

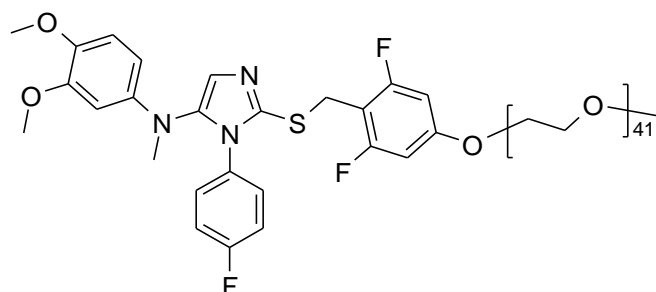
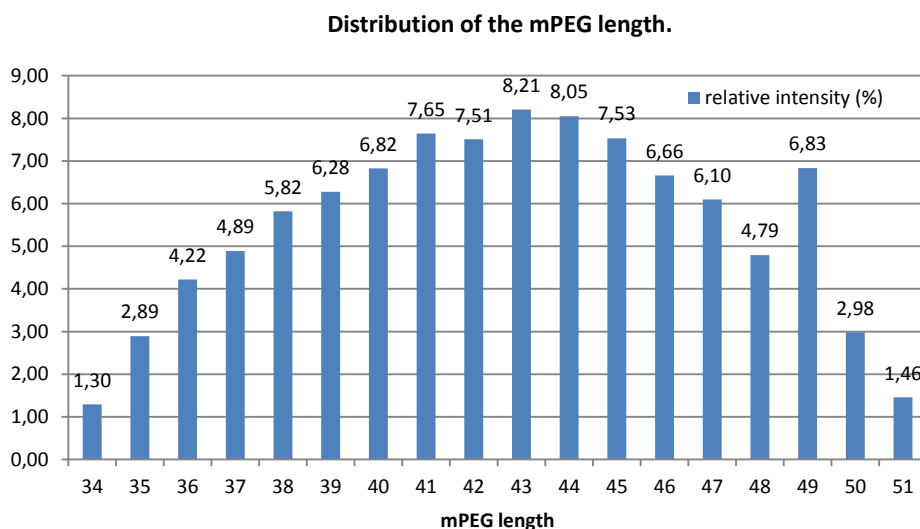
1H -NMR ($DMSO-d_6$) : δ (ppm) 3.23 (s, 3H) ; 3.36-3.76 (m, 278H) ; 4.06-4.14 (m, 2H) ; 4.40 (brs, 2H) ; 5.08 (brs, 1H) ; 6.56-6.76 (m, 2H).



Step 5: 2-[2-[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (average MW = 2413 g/mol)
(53b)

[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-phenyl]-methanol (**53a**) (2.91 g, 1.47 mmol) and TEA (246 μ L, 1.83 mmol) were dissolved in 5 mL dry DCM at 0°C. Mesylchloride (114 μ L, 1.46 mmol) was then added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature overnight. Reaction mixture was then evaporated to dryness. This residue was added to a 50 mL flask loaded with N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**14c**) (553 mg, 1.47 mmol), K_2CO_3 (304 mg, 2.20 mmol), and 4 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature overnight. Reaction mixture was then evaporated to dryness and residue as then purified by FC (cHex/DCM 1/1 to DCM/MeOH 96/4) to give 693 mg of a yellow solid corresponding to the expected product (20%).

MS $[M+H+3H_3O]^{4+}$ m/z = 609.4 ($n = 42$)



Step 6: [2-[2,6-Difluoro-4-(2-methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzylsulfanyl]-3-(4-fluorophenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (average MW = 2347 g/mol) (**53**)

2-[2-[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (average MW = 2413 g/mol) (**53b**) (554 mg, 0.23 mmol) was dissolved in 2.3 mL of ethyl acetate. To this solution were added DIEA (240.8 μ L, 1.38 mmol) and [®]T3P (408 μ L, 0.69 mmol). Reaction mixture was then heated at reflux for 24 hours. Reaction mixture was then evaporated to dryness and purified by preparative HPLC to give 110 mg of a yellowish solid corresponding to the expected product (20%).

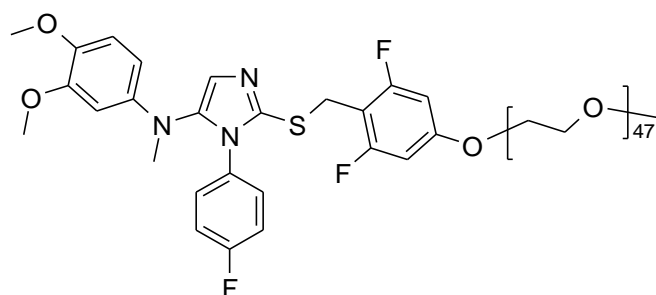
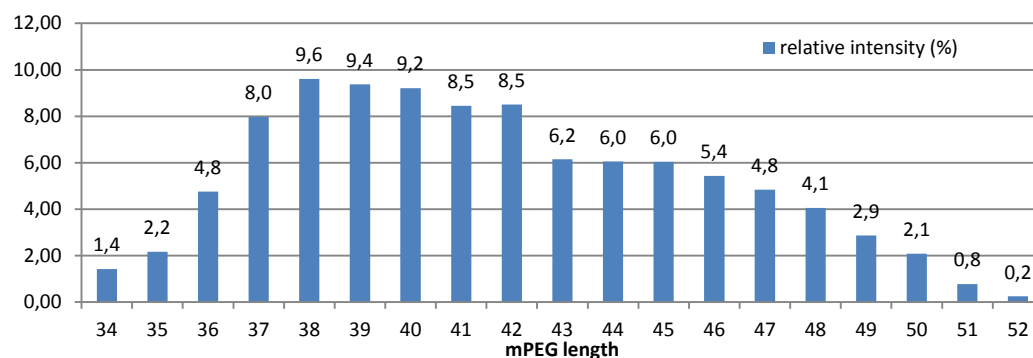
MS [M+H+2H₃O]³⁺ m/z = 786.0 (n = 41)

¹H-NMR (CD₂Cl₂) : δ (ppm) 2.96 (s, 3H) ; 3.36-3.87 (m, 213H) ; 4.04-4.11 (m, 4H) ; 6.15 (dd, 1H, J = 8.70 Hz, J = 2.79) ; 6.27 (d, 1H, J = 2.76 Hz) ; 6.41-6.50 (m, 2H) ; 6.72 (d, 1H, J = 8.73 Hz) ; 6.96-7.07 (m, 5H).

¹³C-NMR (CD₂Cl₂) : δ (ppm) 25.8 ; 40.1 ; 55.8 ; 56.4 ; 58.6 ; 68.3 ; 69.2 ; 70.3 ; 70.4 ; 70.5 ; 70.8 ; 71.9 ; 98.1-98.7 (m) ; 100.1 ; 105.5 ; 105.6 (t, J = 20.5 Hz) ; 112.9 ; 115.7 (d, J = 23.0 Hz) ; 124.0 ; 129.3 (d, J = 8.9 Hz) ; 131.1 (d, J = 3.3 Hz) ; 138.0 ; 139.8 ; 142.8 ; 143.3 ; 149.8 ; 159.7 (t, J = 14.5 Hz) ; 161.6 (dd, J = 247.1 Hz, J = 11.3 Hz) ; 162.3 (d, J = 248.3 Hz).

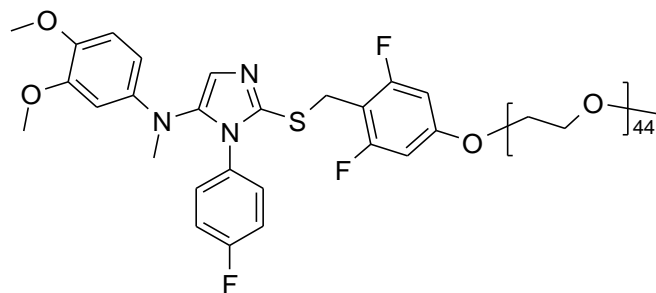
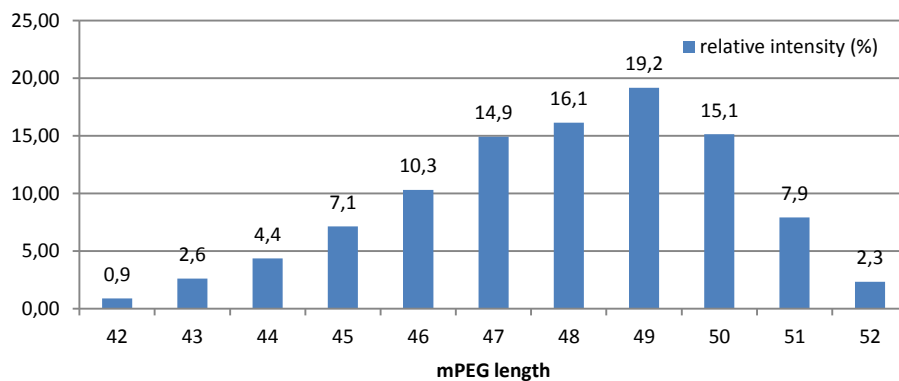
Partie expérimentale

Distribution of the mPEG length.



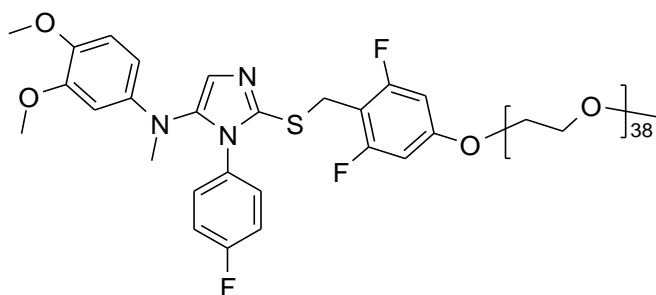
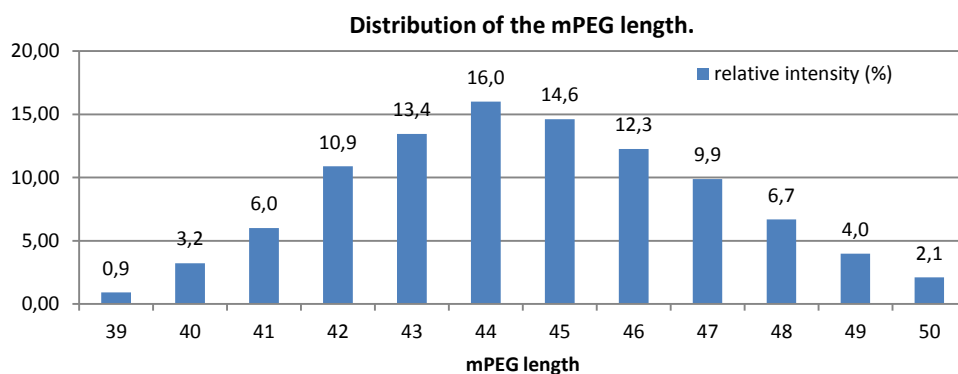
[2-[2,6-Difluoro-4-(2-methoxy-polyethyleneglyoxy)-benzylsulfanylmethyl]-3-(4-fluorophenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (average MW = 2623 g/mol) (**53_{f1}**)
53_{f1} is one of the 3 fraction collected during the RP-HPLC purification.

Distribution of the mPEG length.



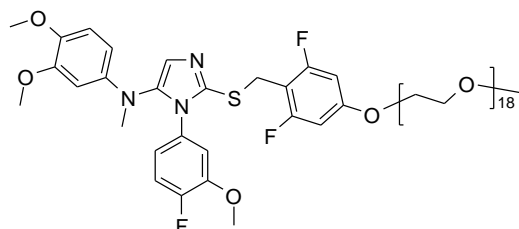
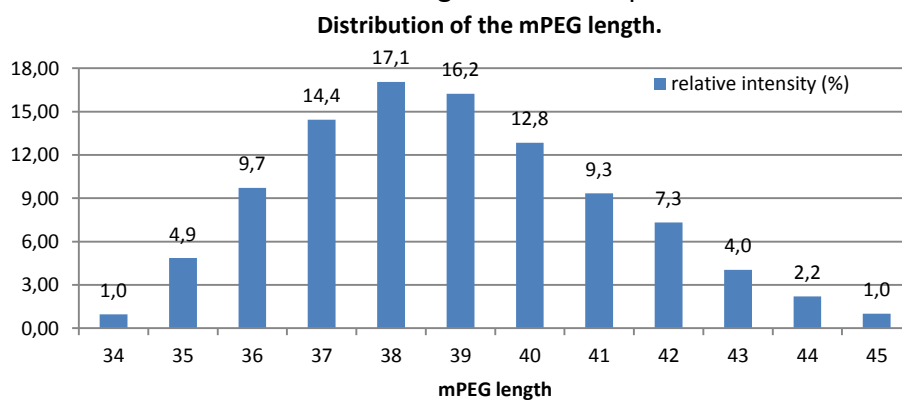
[2-[2,6-Difluoro-4-(2-methoxy-polyethyleneglyoxy)-benzylsulfanylmethyl]-3-(4-fluorophenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (average MW = 2476 g/mol) (**53_{f2}**)

53_{f2} is one of the 3 fraction collected during the RP-HPLC purification.

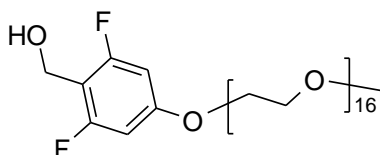


[2-[2,6-Difluoro-4-(2-methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzylsulfanyl]-3-(4-fluorophenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (average MW = 2225 g/mol) (**53_{f3}**)

53_{f3} is one of the 3 fraction collected during the RP-HPLC purification.



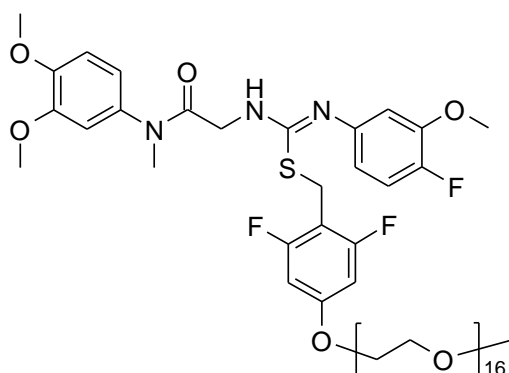
Composé 54



[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-phenyl]-methanol (54a)

Polyethyleneglycol methyl ether tosylate (average molecular weight = 900 g/mol) (1.315 g, 1.46 mmol) was dissolved in acetonitrile (5.5 mL), Polyethyleneglycol methyl ether tosylate (average molecular weight = 900 g/mol) (1.62 mmol, 260 mg) and K_2CO_3 (269 mg, 1.95 mmol) are added. The reaction mixture was stirred overnight under reflux. The reaction mixture was then cooled down, and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum and purified by preparative HPLC, to give a white viscous residue corresponding to the titled product (893 mg, 63%)

MS $[M+H_3O]^+$ $m/z = 808.2$ ($n = 14$)

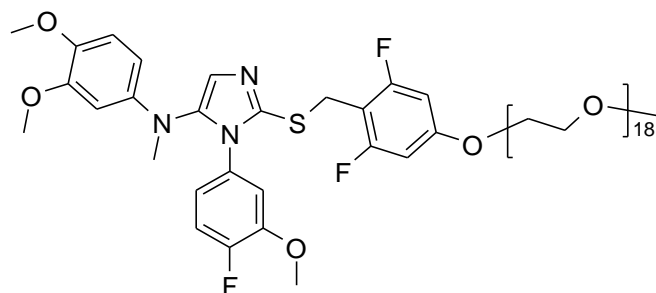


Step 5: 2-[2-[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (average MW = 1209 g/mol) (54b)

[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-phenyl]-methanol (**54a**) (893 mg, 1.02 mmol) and TEA (198 μ L, 1.47 mmol) were dissolved in 2 mL dry DCM at 0°C. Mesylchloride (96 μ L, 1.22 mmol) was then added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature overnight. At that time, TEA (136 μ L, 1.02 mmol) and Mesylchloride (79 μ L, 1.02 mmol) were added again. Reaction mixture was then evaporated to dryness. This residue was added to a 25 mL flask loaded with N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**36a**) (414 mg, 1.02 mmol), K_2CO_3 (211 mg, 1.52 mmol), NaI (76.1 mg, 0.51 mmol) and 4 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 48 hours. Reaction mixture was then evaporated to dryness and purified by preparative HPLC to give the titled product as a pale pink solid (333 mg, 26%).

MS $[M+H+H_3O]^{2+}$ $m/z = 643.5$ ($n = 16$)

1H -NMR (CD_2Cl_2) : δ (ppm) 3.29 (s, 3H) ; 3.35 (s, 3H) ; 3.50-3.72 (m, 80H) ; 3.80-3.90 (m, 13H) ; 4.03-4.17 (m, 4H) ; 6.32 (brs, 1H) ; 6.46-6.56 (m, 3H) ; 6.70-7.02 (5 H).



Step 6: [2-[2,6-Difluoro-4-(2-methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzylsulfanyl]-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (average MW = 1329 g/mol) (**54**)

2-[2-[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (average MW = 1209 g/mol) (**54b**) (266 mg, 0.21 mmol) was dissolved in 2.1 mL of dry EtOAc, and introduced in a 2-5mL microwave tube. The solution was flushed with argon, then DIEA (233 μ L, 1.26 mmol) and $^{\circ}$ T3P in EtOAc (371 μ L, 0.63 mmol) were added, and the mixture was heated under microwave irradiation at 150 $^{\circ}$ C for 10 min (absorption level set on high). Reaction being not complete, DIEA (155 μ L, 0.84 mmol) and $^{\circ}$ T3P in EtOAc (247 μ L, 0.42 mmol) were added again, and reaction mixture was heated a 130 $^{\circ}$ C for 5 min under microwave irradiation. Reaction mixture was evaporated to dryness and purified by preparative HPLC, to give the titled product as a pale orange oil (47 mg, 17%).

MS $[M+H+H_3O]^{2+}$ m/z = 678.6 ($n = 18$)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2) : δ (ppm) 2.93 (s, 3H) ; 3.36 (s, 3H) ; 3.48-3.72 (m, 76H) ; 3.73-3.78 (m, 6H) ; 3.79-3.85 (m, 2H) ; 4.04-4.13 (m, 4H) ; 6.17 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.7$ Hz) ; 6.31 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz) ; 6.40-6.50 (m, 2H) ; 6.57 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 2.3$ Hz) ; 6.63-6.70 (m, 1H) ; 6.75 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz) ; 6.96-7.09 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2) : δ (ppm) 25.8 ; 39.9 ; 55.8 ; 55.9 ; 56.5 ; 58.6 ; 68.3 ; 69.2 ; 70.4 ; 70.5 ; 70.8 ; 71.9 ; 98.1-98.5 (m) ; 99.9 ; 105.5 ; 105.6 (t, $J = 20.2$ Hz) ; 112.9 (d, $J = 2.5$ Hz) ; 113.1 ; 115.7 (d, $J = 19.6$ Hz) ; 119.8 (d, $J = 7.3$ Hz) ; 124.7 ; 131.2 (d, $J = 3.6$ Hz) ; 138.2 ; 139.3 ; 142.7 ; 143.6 ; 147.6 (d, $J = 11.6$ Hz) ; 150.0 ; 151.9 (d, $J = 247.9$ Hz) ; 159.7 (t, $J = 14.1$ Hz) ; 161.7 (dd, $J = 252.8$ Hz, $J = 5.6$ Hz).

B. Compound evaluation

1. Physicochemical properties

a) Solubility

10 µL of a 10 mM solution in DMSO of the compound are diluted in 490 µL of PBS pH 7,4 in Matrix tube (in triplicate) or organic solvent (ACN, MeOH) in Matrix tube (in triplicate). The tubes are gently shaken 24h at room temperature. Then the tubes are centrifuged for 5 minutes at 4000 rpm and filtered over 0.45 µm filters (Millex-LH Millipore). 20 µL of each tube are diluted in 180 µL of MeOH. Analysis is performed thanks to a LC-MS/MS triple-quadrupole system (Xevo TQD) under MRM, SIM or FS detection using the parameters optimized for each compounds. UPLC analysis was performed using a Acquity BEH C18, 50*2,1mm, 1,7 µm; the gradient and the mobile phase (flow rate 600 µL/min-1) used are determined in order to detect the compound of interest with satisfying retention time and peak shape. Acquisition and analysis of data were performed with MassLynx software.

The solubility is determined by the ratio of mass signal area PBS/ organic solvent.

b) LogD

40 µL of a 10mM solution in DMSO of the compound were diluted in 1.960 mL of a 1/1 octanol / PBS at pH 7,4 solution. The mixture was gently shaken 2h at room temperature. 20 µL of each solution was diluted in 180 µL of MeOH and analysed by LC-MS. Each compound is tested in triplicate. Analysis is performed thanks to a LC-MS/MS triple-quadrupole system (Xevo TQD) under MRM or FS detection using the parameters optimized for each compounds. UPLC analysis was performed using a Acquity BEH C18, 50*2,1mm, 1,7 µm; the gradient and the mobile phase (flow rate 600 µL/min-1) used are determined in order to detect the compound of interest with satisfying retention time and peak shape. Acquisition and analysis of data were performed with MassLynx software.

Log D was determined as the logarithm of the ratio of concentrations of product in octanol and PBS, determined by mass signals.

2. TGR5/CRE Luciferase assay

TGR5 activation by compounds and subsequent increase in intracellular cAMP were evaluated using a luciferase reporter gene assay. Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were transiently co-transfected with pCMV tag4b-TGR5h (to follow hTGR5 activation) or pCMV AC6-TGR5m (to follow mTGR5 activation) expression plasmids and the pCRE TA-Luciferase reporter plasmid using the JET PEI reagent (Polyplus transfection). Transfected cells were seeded in 96-well plates and incubated overnight with the test compounds at increasing concentrations tested in duplicate. Lithocolic acid (LCA) at 10 µM was used as a positive reference compound. The cAMP-dependent luciferase expression was followed using the BrightGlo reagent according to the manufacturer (Promega) instructions. Luminescence was read with a Victor3™ V1420 (Perkin Elmer). Data were expressed as percentage of the 10 µM LCA value and EC₅₀ values were calculated using XL fit 5 software.

Concentration-response curves were fitted by a nonlinear regression analysis to a 4 parameter logistic equation.

3. ADME

a) Membrane permeability on Caco2 cells

Drug solutions were prepared in HEPES-buffered Ringer's (RH) solution (NaCl 150 mM, KCl 5.2 mM, CaCl₂ 2.2 mM, MgCl₂ 0.2 mM, NaHCO₃ 6 mM, Glucose 2.8 mM, HEPES 5 mM, water for injection), pH=7.4 at a final concentration of 10 µM for tested drugs. For A → B transport experiment, 0.2 mL of the drug solution was placed on the apical side of the cells and samples were taken from the basolateral compartment. For B → A transport experiment 0.8 mL of the solution was placed on the basolateral side of the cells and samples were taken from apical side. Transport Studies were done in Transwell polycarbonate: HTS 24 well plate inserts (surface area: 0.33 cm²- 0.4 µm pore size). Cells were equilibrated for 10 minutes in transport buffer prior to the transport experiment, and then incubations with compounds were performed at 37 °C under agitation. After 1 hour aliquots were taken from each compartment and sampled in 96 well plate with glass insert.

b) Microsomal stability

Microsomal incubations

All incubations were performed in duplicate in a shaking water bath at 37°C. The incubation mixture were prepared in polypropylene tubes and contained 1 µM test compound (1% methanol), mouse male liver microsomes (0.3 mg of microsomal protein/mL), 5 mM MgCl₂, 1 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, 0.4 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase and 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 in a final volume of 0.5 mL. Sampling points were taken at 5, 10, 20, 30 and 40 min and reactions were terminated by adding ice-cold acetonitrile containing 200 nM internal standard (4 vol). The samples were centrifuged for 10 min at 10000g, 4°C to pellet precipitated microsomal protein, and the supernatant was subjected to LC-MS/MS analysis. Control incubations were performed in triplicate with denaturated microsomes with acetonitrile containing 200 nM internal standard and sampling points were taken at 0 min and 40 min (to evaluate the compound chemical stability in the experimental conditions).

LC-MS/MS analysis

The LC-MS/MS system consisted of an UHPLC Acquity connected to a Xevo TQD mass spectrometer (Waters, Les Ulis, France) equipped with an electrospray ionisation source. Analytes in incubation mixtures were separated by UHPLC using a Acquity BEH C18, 1.7 µm, 50 x 2.1 mm column (Waters). The mobile phase solvents used were: (A) H₂O 0.1% HCOOH; (B) CH₃CN 0.1% HCOOH. The following mobile phase gradient was applied: 2% B during 10s, 2-98% (B) in 1'50; hold at 98% (B) for 30s; 98%-2% B in 5s; 2% B hold for 1'30. The injection volume was 2 µL and the flow rate of 600 µL/min. The desolvation and cone gas flow were respectively 1200 and 50 L/h; the source temperature was 600°C. The capillary and the cone

voltage, the collision energy and the observed transitions were optimized for each compound.

c) *In vivo pharmacokinetics*

Mice : 11 weeks-old C57Bl6/J male mice (25-30 g)

Compounds were formulated in aqueous Tween 0.1% solution at 3.2 $\mu\text{mol/mL}$

After oral administration of the compound at 32 $\mu\text{mol/kg}$, food was removed. Depending on the experiment, blood was sampled; gallbladder was measured and removed, liver, duodenum, jejunum, ileum and colon were removed at several time points and stored on ice. Blood samples were then centrifuged at 5000 rpm for 10 min (at 4 °C), then stored at -80°C. All organs were weighed and stored at -80°C.

Product was extracted from plasmas by protein precipitation using acetonitrile. Organs were crushed using either a TissuLyzer or a sonicator, and product was extracted using MeOH/acetonitrile (1/1). Compound was then dosed by LC-MS/MS (colonne Acquity BEH C18, 50*2.1mm, 1,7 μm ; mobile phase H₂O 0.1% HCOOH / CH₃CN 0.1% HCOOH).

4. *In vivo GLP-1 secretion*

Mice : 10 to 16 weeks-old C57Bl6/J male mice (25-30 g)

Compounds were formulated in aqueous Tween 0.1% solution at 6.4 $\mu\text{mol/mL}$

Compounds/vehicule were orally administrated at 32 to 1.6 $\mu\text{mol/kg}$ to overnight fasted mice. Sitagliptine (25 mg/kg,) was orally administrated 60 to 45 min before blood sampling in EDTA + DPP-4 inhibitor containing tubes. Samples were stored on iced before centrifugation (4500 tpm, 10 min, 4 °C). Active GLP-1 was dosed by ELISA using kit Millipore GLP-1 actif (7-36) Ultra sensible EZGLPHS-35K.